



Susana Margarida Vieira Carreira

Licenciada em Ensino de Física e Química

**Avaliação das propriedades antioxidantes e
antimutagénicas de diferentes cultivares *Vaccinium spp.*:
Partiot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O'Neal, produzidas na
Sub-região do Baixo Vouga**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Lucia Monteiro Durão Leitão

Arguente: Prof. Doutora Ana Sofia Gregório Fernandes

Vogal: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2012



Susana Margarida Vieira Carreira

Licenciada em Ensino de Física e Química

**Avaliação das propriedades antioxidantes e
antimutagénicas de diferentes cultivares *Vaccinium spp.*:
Partiot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal, produzidas na
Sub-região do Baixo Vouga**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL



Setembro 2012

Copyright – Susana Margarida Vieira Carreira, UNL, FCT

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

À Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, por ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Paula Duarte pela excelente orientação científica, pelos conhecimentos que me transmitiu, pela pronta colaboração face a todas as minhas solicitações e total disponibilidade em todo o trabalho desenvolvido e ainda pela amizade, pois sem este apoio incondicional este trabalho não teria sido possível, o meu eterno agradecimento.

Ao Professor Doutor José Rueff, Diretor do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, por ter disponibilizado as instalações e os equipamentos necessários à realização do ensaio ORAC.

À minha colega e amiga Eugénia Rasteiro, pelo apoio e colaboração neste trabalho, bem como pelo incentivo, encorajamento nos momentos mais difíceis ao longo deste percurso. Obrigada pelo que passamos por muito de bom e de mau, pois ficarás sempre no meu coração.

Ao Pedro Oliveira, pelo apoio, colaboração neste trabalho e pela sua total disponibilidade. Um obrigado pela tua descontração, boa disposição e optimismo que teve um papel curcial ao longo deste percurso e não só... E ainda pelo amor, carinho e pela compreensão. Um obrigado por existires na minha vida, pois mesmo as pessoas mais fortes têm momentos de fraqueza e felizmente que têm alguém em quem se apoiar.

À minha família e amigos por acreditarem em mim, pelas palavras de incentivo e encorajamento.

À Mirtilusa, Sociedade de Produtores Hortofrutícolas, Sever do Vouga, por me terem recebido e disponibilizou as amostras das cultivares de mirtilo, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À empresa Mirtisul – Produção de Mirtilos Lda., localizada na Aldeia do Pico – Grândola, que generosamente me recebeu e disponibilizaram amostras de cultivares que, embora não sejam objeto de estudo neste trabalho, foram utilizadas no desenvolvimento das teses dos meus colegas Eugénia Rasteiro e Pedro Oliveira.

Resumo

Estudaram-se as atividades antioxidante (ensaios FRAP, CUPRAC, ORAC, quelação de ferro e sequestro de peróxido de hidrogénio e do radical anião superóxido) e antimutagénica (teste de Ames) em cinco diferentes variedades de mirtilo (Partiot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal) produzidas no ano de 2010, em Portugal, na sub-região do Baixo-Vouga.

Todas as variedades analisadas apresentaram atividade antioxidante, detetada através da avaliação da atividade redutora e de sequestro de espécies reativas de oxigénio, bem como atividade antimutagénica, não tendo demonstrado capacidade de quelação do Fe(II).

Das várias variedades estudadas, a Duke foi a que apresentou um teor mais elevado em polifenóis, tendo apresentado a maior capacidade antioxidante em todos os ensaios realizados, com exceção do sequestro do peróxido de hidrogénio. Por outro lado, a variedade O’Neal foi a que apresentou o mais baixo conteúdo em compostos fenólicos, tendo sido aquela que apresentou mais elevada capacidade de sequestro do peróxido de hidrogénio. Assim, com exceção do sequestro de peróxido de hidrogénio e da quelação de Fe(II), todas as restantes atividades antioxidantes determinadas parecem estar relacionadas com os compostos fenólicos e, particularmente, com as antocianinas presentes nas diferentes variedades de mirtilos estudadas.

Palavras-chave: Mirtilo, Atividade antioxidante, Atividade antimutagénica, Compostos fenólicos

Abstract

In this study it was investigated the antioxidant activity (FRAP, CUPRAC, ORAC, iron chelating activity, hydrogen peroxide scavenging and superoxide anion radical scavenging) and the antimutagenic activity (Ames test) of five blueberry varieties (Partiot, Bluecrop, Duke, EarlyBlue and O'Neal) produced in 2010, in Portugal, in the sub-region of Baixo-Vouga.

All analyzed blueberry varieties presented antioxidant activity, detected by the evaluation of the reductive activity and the scavenging of reactive oxygen species, and antimutagenic activity. The ferrous ions chelating activity of the samples were not demonstrated.

Of the several varieties studied, Duke showed the highest level of total phenolic compounds, and showed the highest antioxidant capacity in all methods except in the hydrogen peroxide scavenging assay. The variety O'Neal showed the lowest content of phenolic compounds, and the higher capacity for scavenging the hydrogen peroxide. Thus, with the exception of hydrogen peroxide scavenging assay and Fe(II) chelation assay, all other antioxidant activities appear to be related to certain phenolic compounds, and particularly with anthocyanins present in the different blueberry varieties studied.

Keywords: Blueberries, antioxidant activity, antimutagenic activity, phenolic compounds

Índice de Matérias

Introdução	1
1. Breve caracterização do mirtilo.....	3
1.1. Variedades de mirtilo.....	3
1.2. Produção e consumo de mirtilo em Portugal	5
1.3. Características físico-químicas e nutricionais do Mirtilo.....	7
2. Mirtilo e importância na saúde.....	10
2.1. Mirtilo alimento funcional	10
2.2. Os compostos fenólicos nos mirtilos.....	11
2.3. Espécies reativas de oxigénio	14
2.4. Sistemas de Defesas Antioxidantes.....	19
2.5. Mutagénios e Antimutagénios nos alimentos	22
2.5.1. Mutagénios alimentares	22
2.5.2. Antimutagénios alimentares.....	25
2.6. Efeitos dos polifenóis na saúde.....	27
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Caracterização das amostras de mirtilo	30
3.2. Reagentes e meios de cultura.....	30
3.3. Preparação dos extratos de mirtilo.....	31
3.4. Determinação dos fenóis totais pelo Método de Folin-Ciocalteu	31
3.5. Quantificação das antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial	32
3.6. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix).....	34
3.7. Avaliação da Capacidade Antioxidante	35
3.7.1. Determinação da capacidade de quelação de Fe(II)	35
3.7.2 Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP (“Ferric Reduction Antioxidant Power”).....	36
3.7.3. Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC (“Cupric Reducing Antioxidant Capacity”)	37
3.7.4. Determinação do sequestro do peróxido de hidrogénio.....	38
3.7.5. Determinação do sequestro do radical anião superóxido.....	39

3.7.6. Determinação do resgate do radical peroxilo pelo ensaio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)	40
3.8. Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do Teste de Ames	42
3.8.1. Caracterização da estirpe de <i>S. typhimurium</i> utilizada	43
3.8.2. Realização dos testes de Ames.....	44
3.9. Análise estatística dos resultados	45
4. Resultados e Discussão	46
4.1. Determinação dos fenóis totais	46
4.2. Quantificação das antocianinas monoméricas totais.....	47
4.3. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix).....	49
4.4. Determinação da atividade antioxidante das diferentes variedades de mirtilo.....	49
4.4.1. Determinação da atividade antioxidante por capacidade redutora da amostra	49
4.4.1.1. Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	50
4.4.1.2. Determinação da atividade de redução do Cu(II) a Cu(I) pelo ensaio CUPRAC	51
4.4.2. Determinação da capacidade de quelação de ferro.....	52
4.4.3. Determinação da atividade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio	52
4.4.3.1. Determinação da capacidade de sequestro do peróxido de hidrogénio por medição da absorção no UV	53
4.4.3.2. Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano	53
4.4.3.3. Determinação da atividade antioxidante através da análise da capacidade de resgate do radical peroxilo pelo ensaio ORAC	54
4.5. Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do teste de Ames	55
4.6. Análise global dos resultados.....	58
5. Conclusão	64
6. Referências Bibliográficas.....	67

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Aspeto da planta de mirtilo <i>Vaccinium spp.</i>	3
Figura 1.2 – Baga de mirtilo.....	4
Figura 1.3 – Mapa da Sub-região Baixo Vouga	7
Figura 2.1 - Compostos fitoquímicos presentes em alimentos de origem vegetal.....	12
Figura 3.1 - Formas estruturais predominantes de antocianinas a diferentes valores de pH.	33
Figura 3.2 - Caraterísticas espetrais das antocianinas em soluções a pH 1,0 e a pH 4,5.....	33
Figura 3.3 - Formação do complexo (Fe^{2+} -TPTZ) após redução do Fe^{3+} por um antioxidante.	36
Figura 3.4 - Redução do complexo Cu(II)–neocuproína a Cu(I)–neocuproína, por ação de uma molécula antioxidante (HA) originando uma molécula de antioxidante oxidada (A+).	37
Figura 3.5 - Redução do NBT^{2+} (A) pelo radical anião superóxido, dando origem ao azul de formazano (B).....	39
Figura 3.6 - Formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH.....	39
Figura 3.7 - Esquema para a decomposição do AAPH originando radicais peroxilo.....	40
Figura 3.8 – Mecanismos propostos para a oxidação da fluoresceína pelo radical peroxilo.....	41
Figura 4.1 – Curva de dose-resposta do t-BHP com a estirpe TA100.	55
Figura 4.2 - Curvas de dose-resposta dos extratos de mirtilo das diferentes variedades (A) Patriot, (B) Bluecrop, (C) Duke, (D) Earlyblue (E) O’Neal na presença e na ausência de t-BHP, na estirpe TA100.	57
Figura 4.3 - Percentagem máxima de inibição da mutagenicidade do t-BHP exercida pelos extratos das variedades de mirtilo Patriot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal.	58

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Composição química e nutricional média de frutos de mirtilo do género <i>Vaccinium</i> (grupos Highbush (<i>V. corymbosum</i> e <i>V. ashei</i>) e Lowbush (<i>V. angustifolium</i>)) por 100 g de parte edível.....	8
Tabela 2.1 - Principais classes de polifenóis	13
Tabela 2.2 - Conteúdo em flavonóides de mirtilos cultivados.....	14
Tabela 2.3 – Caraterização das principais Espécies Reativas de Oxigénio formadas <i>in vivo</i>	17
Tabela 3.1 - Composição da gelose de superfícies por litro.	44
Tabela 3.2 - Composição do meio VB (por litro).	45
Tabela 4.1 - Teor de compostos fenólicos totais nas amostras testadas	46
Tabela 4.2 – Teor de antocianinas monoméricas nas amostras testadas	47
Tabela 4.3 – Teor de sólidos solúveis (grau Brix) nas amostras testadas.....	49
Tabela 4.4 – Valores do ensaio FRAP nas diferentes amostras.....	50
Tabela 4.5 – Valores do ensaio CUPRAC nas diferentes amostras	51
Tabela 4.6 – Percentagem de sequestro do H ₂ O ₂ nas diferentes variedades de mirtilo.....	53
Tabela 4.7 – Valores de inibição do superóxido obtidos nas diferentes variedades de mirtilo.	53
Tabela 4.8 - Valores obtidos nas diferentes variedades de mirtilo no ensaio ORAC.....	54
Tabela 4.9 - Classificação da correlação em função do valor do coeficiente de correlação de Pearson.	59
Tabela 4.10 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e antocianinas monoméricas das cinco amostras estudadas.....	59
Tabela 4.11 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e antocianinas monoméricas nas amostras das variedades Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal.....	60
Tabela 4.12 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante das cinco variedades em estudo.	61
Tabela 4.13 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante das variedades Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal.	61

Simbologia e Notações

AAPH - 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloreto

AH- Aminas heterocíclicas

CAT - Catalase

CUPRAC - *Cupric Reducing antioxidant capacity*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EAT- Equivalentes de α -Tocoferol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

eq – Equivalente

ERO - Espécies reativas de oxigénio

FRAP - *Ferric Reduction Antioxidant Power*

GPX - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GSSG - Glutathione oxidada

HAPs - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

HAT - *Hydrogen atom transfer* (transferência de um átomo de hidrogénio)

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

nm - nanómetro

NADH- Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NADPH- Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NB - Meio de cultura Nutrien Broth

NBT²⁺ - Azul de nitrotetrazólio

NHB - *Northern Highbush Blueberry*

ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

OTA - Ocratoxina A

PhIP - 2-amino-1-metil-6-fenilimidazole[4,5-b]piridina

PMS – Metossulfato de fenazina

r – Coeficiente de correlação de Pearson

RNA - Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SET - *Single electron transfer* (transferência de um elétron)

SHB - *Southern Highbush Blueberry*

SOD - Superóxido dismutase

spp - Espécie

t-BHP - *tert*-Butil-hidroperóxido

TPTZ - 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina

UV – Radiação ultravioleta

VB – Meio de cultura Vogel-Bonner

λ - Comprimento de onda

μm- micrómetro

Introdução

O progressivo crescimento e desenvolvimento do sector alimentar implicou novos hábitos alimentares, associados a uma alimentação mais saudável, que incluem um maior consumo de pequenos frutos entre os quais se destaca o mirtilo (*Vaccinium spp.*). Estes novos hábitos surgiram nos países desenvolvidos e rapidamente se espalharam pelo mundo, observando-se um segmento de adeptos em constante crescimento. Para além de garantir o suprimento das necessidades nutricionais, a seleção dos produtos alimentares visa, igualmente, o fornecimento de alimentos que possam implicar melhorias na saúde, bem-estar e longevidade dos consumidores. Na lista dos alimentos preferenciais estão as frutas por serem altamente nutritivas, sendo importantes fontes de vitaminas e minerais, fibras alimentares e flavonoides com capacidades antioxidantes que podem proteger o organismo contra os efeitos prejudiciais do *stress* oxidativo. As frutas fornecem ainda energia rápida, em função do seu teor em açúcar natural, além de serem de fácil digestão.

O mirtilo está incluído no grupo das pequenas frutas, sendo reconhecido o seu conteúdo rico em antioxidantes, tanto na película como na polpa (Sousa *et al.*, 2007). Diversos trabalhos têm demonstrado a existência nos mirtilos de compostos com atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e anticancerígena (Neto, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007), podendo, no entanto, o teor nestes compostos bioativos variar em função de fatores genéticos e de fatores ambientais, tais como o tipo de solo ou a temperatura.

Em Portugal o mirtilo é conhecido vulgarmente como arando, erva-escovinha ou uva-monte. As plantas nativas encontram-se nas regiões de floresta, matos e pinhais de montanha entre 400 a 2000 metros de altitude, no Alto Minho, Marão e Serra da Estrela. Atualmente, as variedades cultivadas são híbridos que permitem uma melhor adaptação a várias zonas geográficas. O mirtilo é uma baga cujas características sensoriais o tornam apetecível para ser consumido em fresco, como conserva, em gelados, doces, licores e aguardentes, podendo ser também utilizado como corante graças à sua riqueza em antocianinas. A cultura do mirtilo em Portugal apresenta um elevado potencial devido às condições climáticas existentes (Lavadinho *et al.*, 2001).

Tendo em consideração a aceitação, o aumento do consumo de mirtilos por parte dos consumidores, o elevado potencial económico e os potenciais efeitos benéficos na saúde e sabendo que as atividades biológicas dos mirtilos podem variar consoante as características de solo e do clima da região em que são produzidos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante e antimutagénica de cinco variedades de mirtilo (*Vaccinium spp.*) produzidas nas plantações da região de Sever do Vouga e gentilmente cedidas pela Mirtilusa (Sociedade de Produtores Hortofrutícolas),

nomeadamente as variedades Earlyblue, Patriot, Bluecrop, Duke e O'Neal. Tentou-se avaliar o conteúdo em compostos fenólicos totais e, em particular em antocianinas monoméricas totais, das diferentes cultivares. Para avaliar a capacidade antioxidante recorreu-se a diferentes ensaios, nomeadamente, ensaios de avaliação da sua capacidade redutora total, da sua capacidade para sequestrar várias espécies reativas de oxigénio e capacidade de quelação de ferro. Foi ainda avaliado o potencial antimutagénico destas cultivares através do estudo da sua capacidade para inibir a mutagenicidade do mutagénio oxidativo *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP). Tentou-se ainda estabelecer uma correlação entre o conteúdo em compostos fenólicos, em particular em antocianinas, e a atividade antioxidante e antimutagénica das diferentes variedades.

Esta dissertação inicia-se com dois capítulos teóricos, sendo que no primeiro capítulo é feita uma pequena descrição das cultivares de mirtilo em estudo, sua importância económica na Sub-região do Baixo Vouga, sua composição química e propriedades funcionais, e no segundo uma revisão bibliográfica sobre a problemática do *stress* oxidativo e o papel protetor dos antioxidantes, bem como sobre os mutagénios e antimutagénios alimentares. No terceiro capítulo descrevem-se os procedimentos experimentais seguidos e, no quarto apresentam-se os resultados obtidos e a sua respetiva discussão. Por fim, no capítulo cinco, resumem-se as principais conclusões da presente dissertação.

1. Breve caracterização do mirtilo

1.1. Variedades de mirtilo

Os mirtilos pertencem à família das *Ericaceae*, subfamília das *Vaccinoiodae*, género *Vaccinium spp.* (Spiers *et al.*, 2004). Os géneros são muito diversos, contendo de 150 a 450 espécies, sendo, na maioria dos casos arbustos (Figura 1.1) de tamanho e formas variadas (Riegger, 2006).



Figura 1.1 – Aspeto da planta de mirtilo *Vaccinium spp.*

O mirtilo é uma baga (Figura 1.2) de aproximadamente um centímetro de diâmetro e com um peso médio de 1,5 g, sendo o tamanho exato do fruto uma característica da variedade (Eck, 1988). O fruto baciforme e globular é sumarento e tem um sabor agridoce. Amadurece dois a três meses após a floração. A baga pequena com sementes apresenta em geral cor azul com tonalidades variando de mais claro a mais escuro e intenso. A cor do mirtilo é influenciada pela presença de pruína, cera epicuticular, que produz o efeito glauco responsável pela cor azul típica dos mirtilos. Esta camada cerosa constitui uma barreira importante à perda de água, impedindo o murchar do fruto (Albrigo *et al.*, 1980). A baga apresenta uma cicatriz, diametralmente oposta ao ápice, de dimensão e formato variáveis, segundo a espécie e a cultivar. Os mirtilos apresentam um grande número de sementes (Makus e Morris, 1987; Westwood, 1982) que contribuem para um sabor menos acentuado e um certo grau de arenosidade conferido pela presença de escleritos (Sousa *et al.*, 2007). O fruto pode ser consumido *in natura* ou após processamento (congelamento, desidratação, conservas, fabrico de geleias ou licores) (Makus e Morris, 1987).



Figura 1.2 – Baga de mirtilo

As variedades de mirtilos comerciais podem ser divididas em cinco grupos de acordo com características que incluem, entre outras, o genótipo, necessidades de crescimento ou o tipo de fruto produzido (Galletta e Ballington, 1996):

- a) *Northern highbush* (arbusto alto), plantas com mais de dois metros de altura e necessidade de 650 a 850 horas de frio hibernal;
- b) *Half high* (arbusto médio), plantas que atingem 0,5 m a 1,0 metro de altura e apresentam menor exigência em frio que as *highbush*. Este grupo envolve híbridos de *V. angustifolium* e *V. corymbosum*;
- c) *Southern highbush*, plantas de porte alto, conhecidas como *highbush* de baixa exigência em frio, com maior resistência à doença e que suportam solos pobres em matéria orgânica, sendo mais exigentes em água, drenagem e matéria orgânica que *rabbiteye*;
- d) *Rabbiteye* (“olho-de-coelho”), plantas alcançam 2 a 4 m de altura. São características da espécie *V. ashei* o vigor, a longevidade, produtividade, tolerância ao calor e à seca e baixa necessidade em frio. São produtoras de frutos ácidos, firmes e de longa conservação. As limitações dessa espécie são a tendência de rachar a película em períodos húmidos, desenvolver a cor completa das frutas antes do ponto ideal de colheita e longo período para alcançar o máximo de produtividade;
- e) *Lowbush*, são plantas com porte menor que 0,5 m. A maioria pertence à espécie *V. angustifolium*, neste grupo encontra-se o mirtilo do Canadá (*V. myrtilloides* e *V. boreale*).

As espécies de mirtilos com expressão comercial mais elevada pertencem aos grupos *highbush*, *rabbiteye* e *lowbush*, sendo as práticas de manejo diferenciadas para cada um dos grupos, desde a produção de mudas até a colheita e utilização dos frutos (Fachinello, 2008).

Ao longo do tempo, o género *Vaccinium spp.* evoluiu principalmente em climas temperados, nomeadamente no norte do continente Americano, Europa e Ásia, sendo que a maior parte das atuais cultivares foram obtidas por hibridação de diferentes espécies norte-Americanas (Sousa *et al.*, 2007). Em Portugal existem ainda espécies silvestres do género *Vaccinium*: o *Vaccinium myrtillus* (mirtilo Europeu) na Serra do Gerês, o *Vaccinium padifloium* na Ilha da Madeira e o *Vaccinium cylindraceum* (uva-da-serra) no arquipélago dos Açores (Sousa *et al.*, 2006).

Por ser uma espécie frutífera nativa dos Estados Unidos da América e do Canadá são nestes países que se encontram as maiores produções. Segundo a FAO (2010), os Estados Unidos da América produziram 157 451,20 toneladas anuais no período entre 2004 e 2008, ocupando uma superfície de 21 946,80 hectares, tendo este valor representado 50% da produção mundial. O Canadá, segundo maior produtor mundial, produziu, no mesmo período, 81 240,20 toneladas em 30 655,20 hectares, valor que representou cerca de 33% da produção mundial. Os Estados Unidos da América e o Canadá são também os maiores consumidores e exportadores deste fruto.

1.2. Produção e consumo de mirtilo em Portugal

Em Portugal, o progressivo crescimento e desenvolvimento do sector alimentar e a influência dos restantes países da Europa, introduziram novos hábitos alimentares, como o consumo de pequenos frutos, nos quais se inclui o mirtilo. Por outro lado, o nosso país, devido às suas condições edafo-climáticas, apresenta um elevado potencial para a cultura do mirtilo. Nos últimos anos assistiu-se a um aumento da área de produção, que passou de zero para cerca de quarenta e cinco hectares, com tendência para aumentar. O Alentejo e a zona do Sever do Vouga são as principais regiões de produção de mirtilo. A introdução no país das diferentes cultivares de mirtilo tem conduzido à implementação de tecnologias de produção e concomitantemente à necessidade de se determinar a qualidade dos frutos obtidos, de forma a elegerem-se as cultivares com maior interesse económico (Sousa *et al.*, 2007).

As primeiras plantações de mirtilo surgiam em Portugal, na década de 90, no concelho de Sever do Vouga, transformando-se o produto da cultura do mirtilo num acrescento à economia familiar, que foi ganhando maior relevância com o passar dos anos. Atualmente cerca de 95% da produção é exportada, com a inerente mais-valia dos produtores do mirtilo de Sever, colocarem o fruto no mercado europeu, nomeadamente nos Países do norte da Europa, nos meses de Maio/Junho de cada ano, ou seja, antes dos demais concorrentes.

As primeiras experiências de produção em Portugal foram efetuadas em 2007, pela Fundação Lockorn, da Holanda, nos concelhos de Sever do Vouga e Trancoso, e tentavam perceber se haveria condições para a produção precoce de mirtilo. Depois das várias experiências realizadas pela Fundação e a Cooperativa Agrícola de Sanfins, conclui-se que Sever do Vouga reunia condições ideais de características do solo e do micro clima para a produção precoce de mirtilo. A primeira experiência piloto ocorreu na Quinta do Linheiro, localizada na freguesia de Rocas do Vouga. Desde então, a produção deste fruto no concelho tem vindo a crescer em média 15% ao ano, o que tem sido uma mais-valia para a região e tem permitido diversificar o sector agrícola e dinamizar a economia local, tornando-se uma importante fonte de rendimento para as famílias e uma verdadeira alternativa à agricultura tradicional (Serrada *et al*, 2008).

A produção de mirtilo em Sever do Vouga ronda as 120 toneladas, mais de 80% são exportadas, nomeadamente para França, Bélgica e Holanda. A produção nacional é escassa face à procura. O consumo nacional é irrisório apesar de ter duplicado de 2007 para 2008. Em 2010 o preço do mirtilo, foi de cerca de 3,5 euros o quilograma pago ao produtor, sendo posteriormente comercializado a 25/30 euros o quilograma (Costa, 2010). No Alentejo os mirtilos são produzidos por uma empresa designada por Mirtisul, situada na região de Grândola, sendo esta o maior produtor de mirtilo em Portugal. Em 2007 a Mirtisul atingiu uma produção de 140 toneladas em 14 hectares (Sousa *et al.*, 2007).

Os grupos que apresentam maior interesse para as condições climáticas de Portugal são os *Northern Highbush Blueberry* (NHB) e *Southern Highbush Blueberry* (SHB) e eventualmente algumas cultivares do grupo *Rabbiteye*. Na zona centro/norte de Portugal as cultivares que melhor desempenho apresentam, pertencem principalmente ao grupo NHB, ao passo que a sul do Tejo têm-se revelado interessantes os híbridos dos grupos SHB e *Rabbiteye*, por necessitarem de menos horas de frio (Sousa *et al.*, 2007).

De um modo geral, as cultivares do grupo *Northern Highbush*, por necessitarem de um maior número de horas de frio durante o repouso invernal, são as mais adequadas para o norte e centro de Portugal e as cultivares do grupo *Southern Highbush* para o sul. Em Sever do Vouga as cultivares mais utilizadas são de *Vaccinium Corymbosum*. Esta escolha deveu-se a vários fatores: clima, possibilidade de ocorrência de geadas tardias, a resistência a doenças e pragas e ainda, por se tratar de uma plantação comercial, à produção e à qualidade.

As cultivares pertencentes ao grupo *Northern Highbush* são as mais plantadas em todo o mundo, necessitando as plantas de muitas horas de frio para quebrar dormência durante o Inverno e entrar em produção. O intervalo de horas de frio vai de 800 a 1000 horas abaixo dos 7°C. As cultivares *Southern Highbush* necessitam menos horas de frio durante o Inverno para quebra de dormência da

planta, diferindo este número de horas de cultivar para cultivar. O intervalo varia entre 150 a 600 horas de frio abaixo dos 7°C (Sousa *et al.*, 2006).

As cultivares estudadas neste trabalho pertencem maioritariamente ao grupo *Northern Highbush* (variedades Earlyblue, Patriot, Bluecrop e Duke) e apenas uma pertence ao grupo *Southern Highbush* (variedade O'Neal).

As amostras das cultivares em estudo foram gentilmente cedidas pela Empresa Mirtilusa, Sociedade de Produtores Hortofrutícolas, sediada em Sever do Vouga. A área geográfica de produção de mirtilo abrangida por esta empresa engloba alguns concelhos da Sub-região do Baixo Vouga (Figura 1.3) tais como Viseu, Sever do Vouga (mais apto), Águeda e Vale de Cambra.

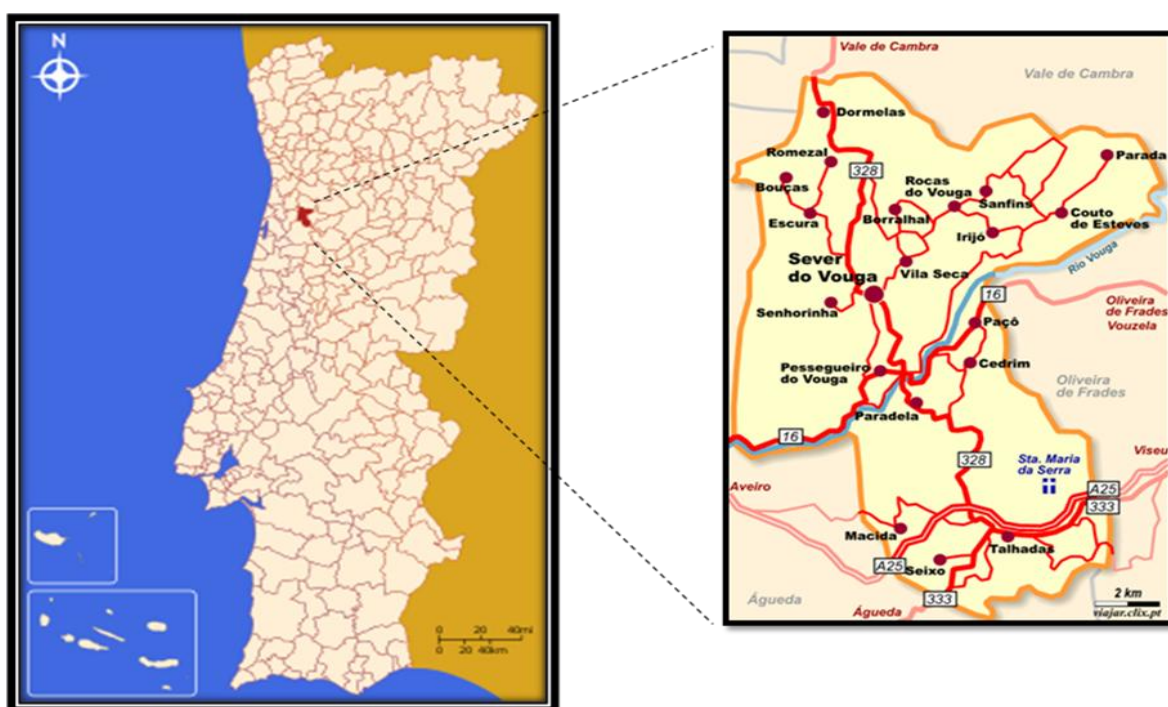


Figura 1.3 – Mapa da Sub-região Baixo Vouga

1.3. Características físico-químicas e nutricionais do Mirtilo

A qualidade das frutas e vegetais é caracterizada com base em atributos como aparência, sabor, textura e valor nutritivo (Chitarra e Chitarra, 2005). Esta caracterização físico-química e nutricional é importante para o controle e melhoria da qualidade dos frutos, para a comercialização no mercado

interno e externo, bem como para o desenvolvimento de técnicas de armazenamento e de manipulação pós-colheita adequadas.

A composição nutricional do mirtilo varia em função de diversos fatores que incluem a variedade, práticas de cultivo, fertilidade do solo, época do ano ou grau de maturação. A tabela 1.1 apresenta a composição química e nutricional média de frutos de mirtilo do género *Vaccinium*.

Tabela 1.1 – Composição química e nutricional média de frutos de mirtilo do género *Vaccinium* (grupos Highbush (*V. corymbosum* e *V. ashei*) e Lowbush (*V. angustifolium*)) por 100 g de parte edível (adaptado USDA, 2011).

Valor nutricional por 100 g edível de mirtilo		
	Energia (kcal)	57,00
	Proteínas (g)	0,74
	Gorduras (g)	0,33
	Açúcares (g)	14,49
	Fibra (g)	2,40
	Água (g)	84,21
Minerais	Cálcio (mg)	6,00
	Ferro (mg)	0,28
	Magnésio (mg)	6,00
	Manganésio (mg)	0,34
	Fósforo (mg)	12,00
	Potássio (mg)	77,00
	Selénio (µg)	0,10
	Sódio (mg)	1,00
	Zinco (mg)	0,16
Vitaminas	Vitamina C (mg)	9,70
	Tiamina (mg)	0,04
	Riboflavina (mg)	0,04
	Niacina (mg)	0,42
	Ácido pantoténico (mg)	0,12
	Vitamina B6 (mg)	0,05
	Folato (µg)	6,00
	Vitamina A (UI)	54,00
	Vitamina E (mg EAT)	0,57
Lípidos	Ácidos gordos saturados, total (g)	0,028
	Ácidos gordos monoinsaturados, total (g)	0,047
	Ácidos gordos polinsaturados, total (g)	0,146

(EAT- Equivalentes de Alfa-tocoferol; UI - Unidades Internacionais)

De acordo com a tabela 1.1 pode observar-se que o mirtilo apresenta um teor de água bastante elevado, sendo superior a 80%. O conteúdo de água nos tecidos depende, entre outros fatores, da disponibilidade hídrica do solo no momento da colheita (Sousa *et al.*, 2007). A perda de água nos frutos conduz à redução de volume e perda de massa, enquanto o elevado teor de água os torna, geralmente, mais suscetíveis à deterioração, aumentando a possibilidade de contaminação microbiológica. O mirtilo apresenta um baixo valor calórico e um baixo teor em lípidos e em proteínas. Os componentes de maior quantidade são os sólidos solúveis constituídos pela glucose e frutose, que representam cerca de 80% da matéria seca, e os sólidos insolúveis constituídos pelas fibras e cinzas. Os frutos produzidos em regiões de verões quentes e secos têm, em relação aos que crescem em regiões mais amenas e húmidas, uma concentração mais elevada de açúcares e um aroma e coloração mais intensos (Rieger, 2006).

Os mirtilos apresentam ainda na sua composição uma variedade de vitaminas (A, B, C, K, ácido fólico), minerais (potássio, magnésio, cálcio, fósforo, ferro, manganésio), açúcares, pectinas e taninos. Os ácidos orgânicos com teores mais elevados no mirtilo são o quínico, o málico e o cítrico. No mirtilo o ácido quínico representa 40% dos ácidos orgânicos, o ácido málico apresenta valores entre 0,06 a 0,14 g/100 g de fruto maduro (Sousa *et al.*, 2007) e o ácido cítrico 0,4 a 0,5 g/100 g de fruto (Raseira e Antunes, 2004).

Os mirtilos são muito ricos em fito nutrientes. A baga contém quantidades significativas de antocianidinas, compostos antioxidantes, pertencentes ao grupo dos flavonoides, que dão cores azul, roxo e vermelho a frutas e legumes. Incluídas nas antocianinas dos mirtilo encontram-se a malvidina, delfinidina, petunidina, peonidina e cianidina. Além das antocianinas, os mirtilos também contêm ácidos fenólicos, estilbenos e outros flavonoides como flavanóis e proantocianidinas (Prior *et al.*, 1998, Sellappan *et al.*, 2002).

O aumento do interesse pelo consumo de mirtilos deriva não só dos seus sabores exóticos mas também das suas alegações terapêuticas (Raseira e Antunes, 2004). Com efeito, nas últimas décadas, muitos estudos têm vindo a associar as antocianinas e outros compostos presentes em algumas espécies de *Vaccinium*, com diversas propriedades biológicas que incluem atividade antioxidante (Wang *et al.*, 1997; Mazza *et al.*, 2002; Lohachoompol *et al.*, 2004), anti-inflamatória (Youdin *et al.*, 2002) e atividade antibacteriana (Zafra-Stone *et al.*, 2007).

2. Mirtilo e importância na saúde

2.1. Mirtilo alimento funcional

A definição mais comum para alimento funcional é a de um alimento para o qual se demonstrou capacidade para influenciar positivamente uma ou mais funções alvo no organismo, além de possuir efeitos nutricionais adequados, desta forma, estes alimentos podem ser relevantes para o bem-estar e a para a saúde, uma vez que o seu consumo está associado com a redução do risco de doenças (Roberfroid, 2002). É ainda assumido que os alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação quotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de compostos fisiologicamente ativos (Candido e Campos, 2005).

Os compostos bioativos podem ser provenientes de produtos de origem animal, como, por exemplo, os ácidos gordos da família ómega 3 ou ácidos gordos conjugados, ou de origem vegetal, tais como, por exemplo, os carotenoides, fitoesteróis, terpenos ou compostos fenólicos. Os compostos bioativos de vegetais (fitoquímicos) compreendem uma grande variedade de classes de compostos químicos com diferentes propriedades físico-químicas (polaridade, solubilidade, capacidade de formar pontes de hidrogénio, potencial de oxidação-redução) que irão determinar tanto o tipo como a eficiência de atividade, assim como o meio e a estrutura celular em que podem atuar (Oliveira e Bastos, 2011).

Os frutos do género *Vaccinium* podem ser considerados alimentos funcionais, sendo utilizados há centenas de anos na medicina tradicional no tratamento de problemas urinários, prevenção de escorbuto e aplicação tópica em ferimentos (Beattie *et al.*, 2005). Estudos mais recentes têm sugerido que os mirtilos possam conferir proteção contra doenças cardiovasculares, ter propriedades antidiabéticas (Neto, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007) e contribuir para melhorar a acuidade visual (Burdulis *et al.*, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Os mirtilos, ou alguns dos seus compostos isoladamente, mostraram ainda ter atividade antimutagénica contra diversos mutagénicos alimentares (Kong *et al.*, 2003), capacidade de induzir a apoptose ou de inibir a proliferação de células neoplásicas *in vitro* (Katsube *et al.*, 2003; Neto, 2007; Wang e Stoner, 2008) e *in vivo* em animais de laboratório (Wang e Stoner, 2008), prevenir problemas inflamatórios como, por exemplo, a artrite reumatoide (Törrönen *et al.*, 2000), reduzir a fragilidade capilar (Kong *et al.*, 2003) e o aparecimento de doenças degenerativas (Alves *et al.*, 2008). O mirtilo parece, igualmente, impedir a fixação e o desenvolvimento da *Escherichia coli*, bactéria causadora de infeções no trato urinário (Smith *et al.*, 2000). Os extratos de mirtilo conseguiram inibir, *in vitro*, o crescimento da bactéria *Helicobacter*

pylori, conhecida como um fator de risco associado ao surgimento de algumas doenças gastrointestinais, incluindo úlcera duodenal e cancro de estômago (Zafra-Stone *et al.*, 2007).

Ensaio realizados em ratos alimentados com extratos de mirtilos mostraram que estes levavam a um aumento das defesas antioxidantes do cérebro e músculo-esquelético, retardando os efeitos do envelhecimento, melhorando as funções cognitivas (Carlsen *et al.*, 2003) e os distúrbios da memória (Ramirez *et al.*, 2005). Estudos em ratos velhos demonstram que administração por 8 semanas de mirtilo promovia uma melhoria da atividade de locomoção (equilíbrio e coordenação) (Joseph *et al.*, 1999).

Todos estes efeitos benéficos na saúde parecem estar, pelo menos em parte, associados com o elevado teor em polifenóis que estes frutos apresentam. Com efeito, numerosos estudos têm vindo a considerar os compostos fenólicos como sendo um dos principais grupos de compostos responsáveis pelos efeitos benéficos das dietas ricas em frutas e vegetais (Horst e Lajolo, 2007).

2.2. Os compostos fenólicos nos mirtilos

Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos de substâncias, não essenciais à dieta, encontrados nos alimentos de origem vegetal, tipicamente, em pequenas quantidades, e englobam mais de 8000 moléculas diferentes (Kris–Etherton *et al.*, 2002). A capacidade dessas moléculas para quelar metais, inibir a ação da lipoxigenase e desativar os radicais livres tem aumentado o interesse dos investigadores pelo estudo destes compostos (Martinez-Valverde *et al.*, 2000). A figura 2.1 representa as principais classes de compostos fitoquímicos ou compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal.

Os compostos fenólicos contêm anéis aromáticos com um ou mais substituintes hidroxilos, variando desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos com uma única estrutura aromática, bifenóis, como ácido elágico, flavonoides contendo 2 a 3 anéis aromáticos e polifenóis mais complexos, contendo de 12 a 16 anéis (Ribeiro e Servalli, 2004). De acordo com a sua estrutura, os compostos fenólicos podem ser divididos em diversas categorias que incluem os ácidos fenólicos (derivados de ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmico), flavonoides, estilbenos (resveratrol) cumarinas e taninos (Peterson e Dwyer, 1998; Ribeiro e Servalli, 2004). Nos alimentos os fenóis pertencem geralmente à classe dos ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas, estilbenos, cumarinas e taninos (Figura 2.1) (Shahidi e Naczk, 1995).

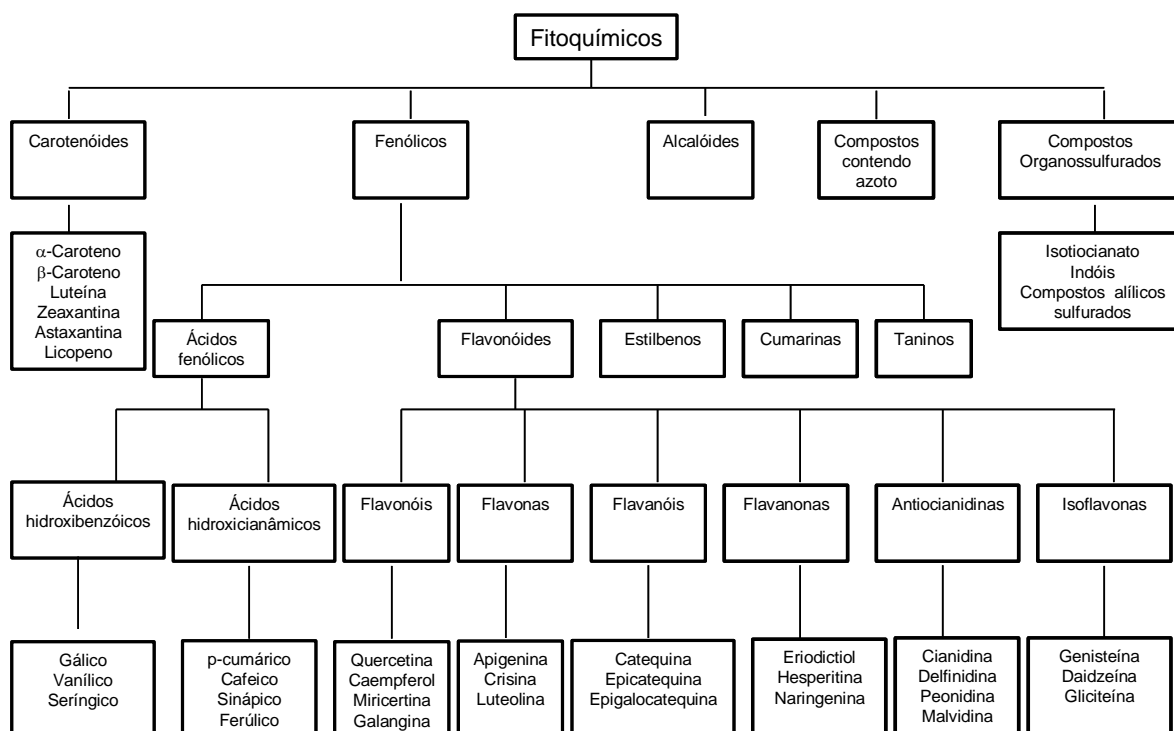


Figura 2.1 - Compostos fitoquímicos presentes em alimentos de origem vegetal (adaptado de Liu, 2004).

De todas as categorias de compostos fenólicos enumeradas, a dos flavonoides é, talvez, aquela que é mais bem estudada. Esta categoria é composta por mais de 4000 compostos diferentes, que têm em comum a estrutura C6-C3-C6, constituída por dois anéis aromáticos ligados por um heterocíclico oxigenado (Liu, 2004). Os flavonoides dividem-se em diversas subclasses, que incluem as subclasses dos flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, anticianidinas e isoflavonas (Figura 2.1). Nestas classes existe uma grande variação de estruturas, que dependem do nível de hidrogenação, hidroxilação e metilação das moléculas. De um modo geral, estes compostos, não se encontram na natureza na forma livre mas sim complexados, principalmente, com açúcares (Lopes *et al.*, 2000). A Tabela 2.1 mostra a estrutura básica das diferentes classes de polifenóis, bem como os principais alimentos onde estes podem ser encontrados.

As frutas vermelhas estão entre as fontes alimentares mais importantes em compostos fenólicos (Häkkinen e Törrönen, 2000). Em particular, o mirtilo (*Vaccinium spp.*) apresenta na sua composição uma elevada concentração em compostos fenólicos, sendo superior à mesma concentração na maioria das frutas (Wolfe *et al.*, 2008).

Nestes últimos anos muitos tem sido os estudos sobre os compostos fenólicos dos mirtilos, Zaderowski e seus colaboradores (2005) identificaram 17 ácidos fenólicos presentes em algumas das cultivares de mirtilo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Assim, foram

identificados os ácidos hidroxibenzóicos gentísico, gálico, o-pirocatecuico, protocatecuico, salicílico, sirínico, vanílico e verátrico. Como representantes dos ácidos hidroxicinâmicos, identificaram-se os ácidos cafeico, m-cumárico, o-cumárico, p-cumárico, 3,4- dimetoxicinâmico, ferúlico, hidroxicafeico e sinápico.

Tabela 2.1- Principais classes de polifenóis (adaptado de Ferguson, 2001).

Classe	Esqueleto básico	Exemplo	Fonte principal
Ácidos hidroxibenzóicos	C6-C1	Ácidos gálico, vanílico, sirínico, protocatéquico e tânico	Comum nas plantas superiores e fetos
Ácidos hidroxicinâmicos	C6-C3	Ácidos ferúlico, <i>p</i> -cumárico, cafeico e sinápico.	Comum nas plantas superiores, muitas vezes como componentes da parede celular
Cumarinas, isocumarinas	C6-C3	Umbeliferona, esculetina, escopoletina	-
Estilbenos	C6-C2-C6	Resveratrol	Especialmente na pele das uvas
Antraquinonas	C6-C2-C6	-	-
Flavonóides	C6-C3-C6	Apigenina, genistéina, caempferol, epigallocatequina galato, miricetina, quercetina	Difundidos por todo o reino vegetal.
Diarylheptanos	C6-C7-C6	Curcumina, iaquichinona A e B	Presentes no gengibre
Lignanas	(C6-C3) ₂	-	Comum nas sementes de linho
Ligninas	(C6-C3) _n	-	Componentes das paredes celulares de diversas plantas (Fibra dietética)

As antocianinas (antocianidinas glicosiladas) identificadas nos mirtilos foram a delfinidina-3-galactose, delfinidina-3-glucose, delfinidina-3-arabinose, cianidina-3-galactose, cianidina-3-glucose, petunidina-3-galactose, cianidina-3-arabinose, petunidina-3-glucose, peonidina-3-galactose, petunidina-3-arabinose, peonidina-3-glucose, malvidina-3-galactose, peonidina-3-arabinose, malvidina-3-glucose e malvidina-3-arabinose (Blumenthak *et al.*, 2000; Faria *et al.*, 2005; Zadernowski *et al.*, 2005). Além das antocianinas, os mirtilos também contêm ácidos fenólicos, estilbenos e outros flavonoides como flavonóis, flavanóis e proantocianidinas (tabela 2.2). O perfil exato destes compostos, bem como as quantidades em que se encontram, variam, não só, com a cultivar, como também com aspetos climáticos, podendo algumas diferenças resultar de diferentes

graus de *stress* hídrico, da maior ou menor disponibilidade de nutrientes e da intensidade da radiação ultravioleta (Giovanelli e Buratti, 2009).

Tabela 2.2 - Conteúdo em flavonóides de mirtilos cultivados (Adaptado de USDA, 2011).

Conteúdo em flavonóides mg/100 g de edível de mirtilo		
Classe	Flavonóide	Valores médios
Antocianidinas	Cianidina	7,10
	Delfinidina	30,91
	Malvidina	59,64
	Peonidina	15,36
	Petunidina	28,02
Flavanóis	(-) -Epicatequina	0,62
	(-) -Epigallocatequina	0,66
	(+) -Catequina	5,29
	(+) -Galocatequina	0,12
Flavonas	Luteolina	0,20
Flavonóis	Caempferol	1,66
	Miricetina	1,26
	Quercetina	7,67
Proantocianidinas	Monómeros	3,46
	Dímeros	5,71
	Trímeros	4,16
	4-6 monómeros	19,57
	7-10 monómeros	14,55
	Polímeros	129,05

Os compostos fenólicos interferem em alvos fisiológicos específicos, parecendo modelar a defesa contra processos oxidativos, inflamatórios e mutagénicos, os quais estão relacionados com o desenvolvimento de diversas patologias, podendo, desta forma, os compostos fenólicos ser considerados como essenciais para a manutenção da saúde (Oliveira e Bastos, 2011).

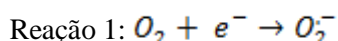
2.3. Espécies reativas de oxigénio

Espécies reativas de oxigénio (ERO) é nome genérico dado a uma variedade de moléculas e radicais livres derivados do oxigénio. Os radicais livres são moléculas reativas que apresentam um eletrão desemparelhado. São produzidos continuamente nas células, podendo ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular (Holmqvist *et al.*, 1994), no decurso de processos metabólicos oxidativos como a respiração aeróbia ou processos que envolvam a atuação das enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclo-oxigenases, lipoxigenases ou monoxigenases como os citocromos P450. Para além destes processos endógenos existem ainda fontes exógenas capazes de

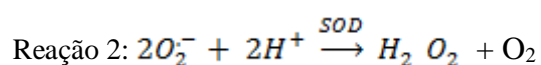
induzir um aumento da produção de ERO. Nestas fontes exógenas encontram-se a exposição ao ozono, à radiações gama e ultravioleta, a diversos compostos presentes na dieta, fármacos ou tabaco (Holmqvist *et al.*, 1994).

Diversas evidências científicas têm comprovado que as ERO podem desempenhar papéis fisiológicos importantes ao funcionarem como mensageiros secundários nas células de mamíferos, regulando vias de transdução de sinal, que controlam a expressão de genes e a indução de alterações pós-traducionais de proteínas, estando, assim, implicadas no controlo dos processos de divisão e diferenciação celular (Al-Gubory *et al.*, 2010). Além disso as ERO são de extrema utilidade quando há necessidade de ativação do sistema imunológico e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (Schneider e Oliveira, 2004).

A formação das ERO deve-se ao fato do oxigénio ter uma elevada tendência para receber um eletrão de cada vez. A adição de um eletrão a uma molécula de oxigénio no estado fundamental origina a formação de um radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Schneider e Oliveira, 2004) (reação 1).

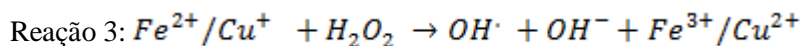


O radical anião superóxido, pelo processo de dismutação, pode receber mais um eletrão (originando o ião peróxido) e dois iões hidrogénios formando o peróxido de hidrogénio. Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que se encontra em quantidades elevadas nas células dos mamíferos e acelera 10^4 vezes a frequência do processo de dismutação espontânea a pH fisiológico (Yu, 1994) (reação 2).

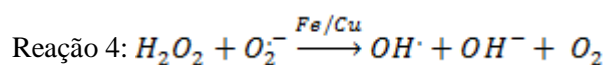


Enquanto que a dismutação do radical anião superóxido produz o peróxido de hidrogénio, que por sua vez pode ser reduzido a água e O_2 , a sua protonação conduz ao aparecimento do radical peróxido (HOO^{\bullet}).

Quando o ião peróxido recebe mais um eletrão e um ião de hidrogénio é formado radical hidroxilo (OH^{\bullet}), que é um intermediário muito reativo, podendo reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácido nucleicos (Jenkins, 1988). O radical hidroxilo pode ser formado quando o peróxido de hidrogénio reage com os iões ferro e cobre, esta reação é conhecida pela reação Fenton (reação 3) (Schneider e Oliveira, 2004).



Os íons dos metais de transição de ferro e cobre podem funcionar como catalisadores na reação entre o peróxido de hidrogénio e o radical anião superóxido, conduzindo, igualmente, à formação do radical hidroxilo. Esta reação é conhecida por reação de Haber-Weiss (reação 4) (Schneider e Oliveira, 2004).



Os radicais anião superóxido e hidroxilo são designados por radicais livres porque apresentam eletrões desemparelhados na sua orbital mais externa. O peróxido de hidrogénio não é um radical livre, mas é metabolito de oxigénio parcialmente reduzido. Outra espécie reativa de oxigénio é o singlete de oxigénio que é uma forma de oxigénio com spin alterado.

O radical anião superóxido é o precursor da maioria das ERO (Covarrubias *et al.*, 2008). Para além das já citadas as ERO incluem ainda outras espécies, tais como, os radicais alcóxido (RO^{\cdot}) e hidroperoxilo (HOO^{\cdot}), o ácido hipocloroso, o ozono e o peroxinitrito (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Todas as ERO têm as suas características, mostrando diferentes reatividades e tempos de semi-vida (Yu, 1994) (tabela 2.3).

As espécies radicalares têm um tempo de semi-vida curto, reagindo rapidamente com outras moléculas. Por outro lado, as espécies não radicalares podem possuir tempos de semi-vida mais prolongados, podendo variar de partes de segundos até horas, dependendo da espécie em causa e também de outros fatores, como o pH ou a presença de outros compostos. De uma forma geral, espécies com maior tempo de semi-vida podem difundir-se e ir interagir e causar danos em alvos biológicos mais afastados do seu local de produção. Por exemplo, o radical anião superóxido, apesar de ser uma espécie radicalar, possui um tempo de semi-vida suficientemente longo que lhe permite mover-se e interagir com alvos biológicos mais distantes do seu local de produção. Pelo contrário, os

possíveis danos causados pelo radical hidroxilo estão mais confinados aos alvos biológicos que se encontram imediatamente adjacentes ao seu local de produção (Kohen & Nyska, 2002).

Tabela 2.3 – Caraterização das principais Espécies Reativas de Oxigénio formadas *in vivo* (Ribeiro *et al.*, 2005).

Intermediário	Comentário	Semi-Vida	Sítios de formação
Radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Formado a partir da redução parcial do oxigénio molecular por eletrão	Decomposição enzimática	Reação de autooxidação envolvendo flavoproteínas e ciclo redox
Peróxido de hidrogénio (H_2O_2)	Formado a partir da redução parcial do oxigénio molecular por dois eletrões	Decomposição enzimática	Vias catalisadas por oxidases, e pela superóxido dismutase.
Radical Hidroxilo (OH^{\bullet})	Formado a partir da redução do oxigénio molecular, por três eletrões nas reações de Fenton e Haber-Weiss, catalisadas por metais	10^{-9} s	Locais adjacentes à formação de anião superóxido/ peróxido de hidrogénio na presença de metais, principalmente do ferro; produto da reação do óxido nítrico com o radical superóxido.
Radical alcóxido (RO^{\bullet})	Radical orgânico centrado no oxigénio	10^{-6} s	Intermediário na peroxidação de lípidos de membrana.
Radical Peroxilo(ROO^{\bullet})	Formado a partir de hidroperóxidos orgânicos	7 s	Intermediário na peroxidação de lípidos de membrana.
Oxigénio Singlete	Primeiro estado excitado do oxigénio molecular	10^{-5} s	Sem sítios metabólicos definidos

Aumentos descontrolados nas concentrações dos oxidantes, situação que se designa por *stress* oxidativo, levam a uma reação em cadeia, mediada pelas ERO, que atacam, indiscriminadamente proteínas (Stadtman e Levine, 2003), lípidos (Rubbo *et al.*, 1994) e DNA (Richter *et al.*, 1988), comprometendo as funções biológicas normais. O alvo principal do *stress* oxidativo pode variar, dependendo da célula, do tipo de exposição e severidade do *stress* (Fridovich, 1998). As lesões oxidativas no DNA e em outras estruturas celulares, estão provavelmente relacionadas com o processo de envelhecimento celular. A eventual degenerescência celular, deve-se à senescência do DNA, devido ao acumular de lesões e desempenho menos eficiente da sua função informativa (Fridovich, 1998).

Muitas patologias estão associadas a um aumento na formação de radicais livres ou a uma redução da capacidade de defesa antioxidante, ou simultaneamente a ambas as situações. O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes pode ser então o limiar entre a saúde e o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis e de outras condições patológicas, como doenças neurológicas inflamatórias, aterosclerose, cancro e diabetes (Halliwell, 2007a e b, Rahman *et al.*, 2006, Vatten e Shetty, 2005).

A oxidação de proteínas pode acarretar danos em recetores e transportadores celulares, enzimas, vias de transdução de sinais, pode ainda ativar o sistema imunitário, induzir a formação de anticorpos e originar o aparecimento de doenças autoimunes (Galloway e Handy, 2003). As lesões oxidativas em proteínas podem ainda causar danos indiretos em outras biomoléculas, por exemplo, as lesões nos sistemas enzimáticos de reparação do DNA podem elevar os níveis de lesões não reparadas nesta molécula e, deste modo, contribuir para o aumento da frequência de mutações. As lesões nas proteínas envolvidas na manutenção essencial do gradiente iónico entre os fluídos do exterior e do interior das células pode comprometer a manutenção destes gradientes (Halliwell e Gutteridge, 1989).

A susceptibilidade das proteínas depende da sua composição em aminoácidos e da importância que os aminoácidos mais susceptíveis têm na sua estrutura tridimensional e atividade catalítica. Os produtos mais comuns, resultantes da oxidação proteica são carbonilos (Kohen & Nyska, 2002). Algumas patologias, como por exemplo artrite reumatoide, doença de Alzheimer, síndrome de distúrbio respiratório, doença de Parkinson e aterosclerose, estão associadas ao aumento destes produtos de oxidação proteica (Zwart *et al.*, 1999).

Existem evidências do envolvimento das ERO no desenvolvimento do cancro, quer por efeitos diretos, por meio ataque químico às bases do DNA ou à desoxirribose, quer indireto, pela alteração dos processos de transdução de sinal, proliferação e morte e celular ou ainda da comunicação intercelular (Halliwell e Gutteridge, 1989). A modificação das bases do DNA pode levar ao aparecimento de mutações (Beckman e Ames, 1997).

A peroxidação lipídica é um processo bioquímico que envolve a oxidação dos ácidos gordos polinsaturados como os componentes das membranas celulares. Os danos que a peroxidação lipídica pode causar nas membranas biológicas podem conduzir à lise celular. Por outro lado, no decurso das reações de lipoperoxidação podem formar-se compostos capazes de reagir com diversas biomoléculas, incluindo o DNA, causando danos celulares (Chung *et al.*, 1996). Para além da lipoperoxidação de ácidos gordos polinsaturados, foi igualmente descrito que as ERO podem modificar as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e, desta forma, contribuir para a patogénese da aterosclerose (Ryan e Aust, 1992).

As doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2011). O *stress* oxidativo está associado a diversas destas doenças, tais como, por exemplo, a doença arterial coronária, hipertensão ou enfarte do miocárdio. Também a diabetes mellitus não dependente de insulina parece estar associada ao *stress* oxidativo. Este tipo de patologias é multifatorial e inclui inflamação vascular e aumento da geração vascular do radical anião superóxido e de outras ERO (Kojda e Harrison, 1999).

Para combater as espécies reativas de oxigénio os organismos aeróbios possuem um sistema de defesa antioxidantes endógenos, o qual inclui várias enzimas e moléculas antioxidantes de elevada e baixa massa molecular (Kaur e Kapoor, 2001). Para além dos antioxidantes endógenos existem ainda os antioxidantes exógenos, que são aqueles que têm de ser obtidos através da dieta e que incluem o ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina E), carotenóides e os compostos fenólicos que englobam diversos dos antioxidantes mais ativos presentes nas frutas e nos vegetais (Soares, 2002).

2.4. Sistemas de Defesas Antioxidantes

A manutenção da vida aeróbica na terra só é possível porque os organismos aeróbios evoluíram no sentido de desenvolver mecanismos de defesa capazes de minimizar os efeitos oxidantes do oxigénio. A definição, em termos biológicos, de antioxidante é a de “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, significativamente previne a oxidação deste substrato” (Halliwell e Gutteridge, 2000). O termo “substrato oxidável” refere-se a todo o tipo de molécula encontrada *in vivo*. Assim, a principal função dos sistemas de defesa antioxidante dos organismos é o de inibir ou reduzir os danos celulares causados pelas espécies reativas de oxigénio.

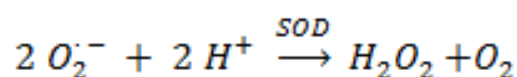
De acordo com o seu modo de ação, os antioxidantes podem classificar-se como antioxidantes de prevenção (impedem a formação de EROs), eliminação (impedem o ataque das EROs às células) e de reparação (Alderton *et al.*, 2001). Nos mecanismos de reparação de danos causados pelas EROs encontram-se os sistemas enzimáticos que favorecem a reconstituição das membranas celulares danificadas e os sistemas enzimáticos de reparação do DNA, capazes de reparar as lesões oxidativas que ocorrem nesta biomolécula. As lesões oxidativas podem ser reparadas através de diferentes mecanismos: reparação por excisão de bases, reparação por excisão de nucleótidos e reparação de erros de emparelhamento (Lunec *et al.*, 2002).

Exemplos de sistemas de ação antioxidante por prevenção de EROs, são a restrição de spin do oxigénio que diminui a sua reatividade face às biomoléculas, o transporte do oxigénio na forma ligada

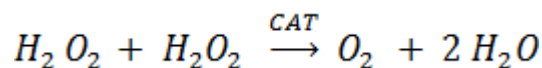
e não livre e a quelação de metais durante o transporte e armazenamento, evitando a ocorrência da reação de Fenton (Sies, 1993, citado por Ribeiro *et al.*, 2005).

A eliminação dos EROs formadas pode ser efetuada através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Dentro dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX). Estas enzimas desativam diversas EROs inativando, assim, os seus efeitos negativos sobre o organismo (Ribeiro *et al.*, 2005).

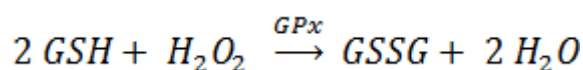
A SOD catalisa a dismutação do radical anião superóxido a peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Yu, 1994).



A CAT desempenha importante papel na eliminação do H₂O₂, promovendo a sua catálise até água. A CAT atua apenas nas porções aquosas da célula, portanto, as zonas lipídicas, como a membrana celular, permanecem desprotegidas e suscetíveis a ação do peróxido de hidrogénio (Ribeiro *et al.*, 2005).



A GPX também funciona como mecanismo de proteção contra o *stress* oxidativo, removendo o peróxido de hidrogénio ao mesmo tempo que converte a glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG) (Ferrari *et al.*, 1985).



Desta forma, a SOD, a CAT e a GPX evitam a acumulação tanto do radical anião superóxido como do peróxido de hidrogénio, contribuindo, desta forma, para a diminuição da produção do radical hidroxilo, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (Yu, 1994).

A presença zinco (Zn), cobre (Cu), manganésio (Mn) e selénio (Se), além de quantidades suficientes de vitaminas é essencial para a produção das enzimas antioxidantes. Tanto o Cu como o Zn e o Mn são particularmente importantes para a produção da superóxido dismutase, sendo o Mn particularmente importante para a síntese da SOD mitocondrial, onde a maior parte dos radicais livres são produzidos. O Se é essencial para a formação da GPX e a vitaminas C e do complexo B são

necessárias para a produção da CAT em grandes quantidades e da GPX. A vitamina B6 (piridoxina), por exemplo, parece desempenhar um papel fundamental na biossíntese da GPX. Assim, o consumo regular de determinados minerais e vitaminas é indispensável para o correto funcionamento do sistema antioxidante do organismo (Ribeiro *et al.*, 2005).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como, por exemplo, a bilirrubina, ceruloplasmina, melatonina, coenzima Q, ácido úrico e, de forma muito importante, a glutathione reduzida (GSH) (Regulski e Tully, 1995; Schneider e Oliveira, 2004) e compostos não sintetizados pelo organismo e que têm que ser ingeridos através da dieta regular, ou via suplementação, como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e compostos fenólicos (Schneider e Oliveira, 2004). Da interação entre estas moléculas antioxidantes e as EROs pode resultar o aparecimento de espécies radiculares derivadas da molécula antioxidante, sendo que estes são por definição pouco reativos. As vitaminas atuam de forma conjunta em diferentes compartimentos intracelulares. Com características lipossolúveis, as vitaminas A e E atuam essencialmente ao nível das membranas celulares enquanto a vitamina C, por ser hidrossolúvel, atua no citosol, participando ainda na reoxidação das vitaminas lipossolúveis (Regulski e Tully, 1995).

A maioria das defesas antioxidantes não-enzimáticas não são sintetizadas endogenamente pelo ser humano, devem ser obtidas através da dieta. O reino vegetal dispõe de uma enorme gama de compostos com potencial antioxidante *in vivo* (Hermes-Lima, 2004). Daqui a importância da relação entre a nutrição e as defesas antioxidantes. Com efeito, existem evidências epidemiológicas significativas que o consumo de alimentos ricos em antioxidantes está associado a um envelhecimento saudável e à longevidade funcional (Rice-Evans e Miller, 1997). Dentro dos compostos antioxidantes produzidos pelos vegetais a categoria dos polifenóis é a mais diversificada, compreendendo uma ampla variedade de compostos e de fontes alimentares de origem vegetal (Shahidi e Naczk, 1995), entre os quais se encontram os mirtilos.

Os polifenóis podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos e são, portanto, classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e secundários. São considerados primários os compostos de ação antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de EROs graças à doação de átomos de hidrogénio (mecanismo HAT de hydrogen atom transfer) ou atividade redutora ou de transferência eletrónica (mecanismo SET de single electron transfer), o que transforma os radicais em substâncias estáveis. Os antioxidantes secundários apresentam uma grande variedade de modos de ação: Capacidade de quelação de iões metálicos, em especial o Fe^{2+} e o Cu^{+} , evitando, deste modo, a formação de radicais hidroxilo através das reações de Fenton; Indução das enzimas antioxidantes

(catalase, superóxido dismutase ou glutathione peroxidase); Inibição de enzimas oxidativas como a xantina oxidase ou as ciclooxygenases; Absorção de radiação ultravioleta (Maisuthisakul *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008).

2.5. Mutagêneos e Antimutagêneos nos alimentos

2.5.1. Mutagêneos alimentares

A ingestão de alimentos constitui uma das principais vias de exposição do homem a diferentes compostos químicos. Algumas desses compostos podem ter atividade mutagénica/cancerígena ou antimutagénica; isto é, podem induzir mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores, enquanto outros podem atenuar ou anular os efeitos destes. Muitos destes compostos encontram-se presentes nos alimentos de forma natural enquanto que outros são adicionados ou produzidos durante o seu processamento e o armazenamento (Antunes e Araújo, 2000).

A macromolécula do DNA possui uma estrutura complexa, passível de sofrer modificações por exposição a agentes potencialmente mutagénicos (Wogan *et al.*, 2004). O DNA, ao longo da vida, vai sofrendo alterações que se denominam por mutações, podendo estas ser causadas por erros que ocorrem durante o processo de replicação, pela exposição a mutagêneos endógenos, como, por exemplo, as espécies reativas de oxigénio, ou induzidas por exposição a agentes externos. Estes agentes externos podem ser divididos em três classes:

- 1) Agentes físicos, como as radiações ultravioleta e ionizantes;
- 2) Agentes biológicos, como alguns vírus, que se integram ao genoma celular interrompendo as sequências génicas ou promovendo rearranjos génicos;
- 3) Agentes químicos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ou as N-nitrosaminas.

Os compostos químicos capazes de lesar o DNA são, normalmente, compostos de natureza electrofílica capazes de reagir com esta molécula causando-lhe alterações, que podem envolver apenas um par de bases ou podem envolver deleções, inserções ou rearranjos de segmentos de nucleótidos (Miller e Miller, 1986). Dependendo dos genes em que ocorrem e do tipo de alteração que provocam, as mutações podem causar maior ou menor perturbação ao funcionamento celular. Assim, enquanto que umas mutações podem não implicar mudanças detetáveis na atividade metabólica celular, outras ser letais para célula. Em particular, quando ocorrem nos genes envolvidos no processo de divisão

celular ou nos genes responsáveis pela manutenção da integridade do DNA, as mutações podem conduzir ao aparecimento de tumores (Bishop, 1991).

Os compostos mutagénicos, como já foi referido anteriormente, podem estar presentes em produtos alimentares de forma natural, accidental (caso dos contaminantes ambientais) ou ser gerados no decurso do seu processamento ou conservação (Ferguson e Philpott, 2008). Alguns agentes mutagénicos alimentares são a aflatoxina B₁, ocratoxina A, vários alcalóides pirrolizidínicos, aminas heterocíclicas (AH), como, por exemplo, a 2-amino-1-metil-6-fenilimidazole[4,5-b]piridina (PhIP), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), como, por exemplo, o benzo(a)pireno, as N-nitrosaminas e produtos das reações de Maillard de que é exemplo a acrilamida.

A aflatoxina B₁ é um metabolito produzido pelo fungo *Aspergillus flavus*, que pode crescer em cereais, como o milho ou o arroz, e frutos secos, como o amendoim, mal armazenados (Busby e Wogan, 1984). As populações com uma exposição alimentar elevada a esta micotoxina apresentam um aumento da incidência de hepatocarcinomas, especialmente quando em associação a infeção pelo vírus da hepatite B (Hussain *et al.*, 2007). A ocratoxina A (OTA) é também uma micotoxina produzida por fungos através de contaminação de produtos alimentares mal armazenados. Esta micotoxina é nefrotóxica e tem sido associada ao desenvolvimento de tumores do trato urinário. O mecanismo de genotoxicidade da OTA parece envolver a formação de adutos de DNA e a formação de espécies reativas de oxigénio (Pfohl-Leszkowicz e Manderville, 2007).

Os alcalóides pirrolizidínicos são comuns em plantas alimentares, especialmente as utilizadas como medicamentos tradicionais. Os seres humanos podem ser expostos a este grupo de compostos de uma forma direta, por ingestão das ervas ou dos chás com elas preparados, ou de forma indireta, por ingestão de produtos derivados destas plantas, como o mel, ou de produtos obtidos a partir de animais com elas alimentados, como, por exemplo, o leite. Estes alcaloides só se tornam reativos face ao DNA após sofrerem metabolização pelas enzimas de biotransformação (Fu *et al.*, 2004).

As aminas heterocíclicas são substâncias indesejadas produzidas durante a exposição de alimentos a temperaturas elevadas. Muitas AH são formadas ao assar, fritar ou grelhar alimentos ricos em proteínas, como as carnes e o pescado (Delfino *et al.*, 2000). As AH encontram-se entre as substâncias mutagénicas conhecidas mais potentes, causando tumores das glândulas mamárias, próstata, pulmão, cólon, pele, pâncreas, fígado e principalmente bexiga em animais de laboratório. Existem ainda evidências de que AH afetam o sistema vascular, as glândulas salivares e de que levam à degeneração do miocárdio (Gross e Grüter, 1992; Felton *et al.*, 2007; Garcia-Closas *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2008). As aminas heterocíclicas também requerem metabolização para se tornarem reativas face ao DNA (Felton *et al.*, 2007). Dados epidemiológicos recentes apontam no sentido da existência de uma associação entre a exposição alimentar às AH e o aparecimento de cancro da bexiga em humanos,

sendo esta associação mais significativa no grupo da população com polimorfismos genéticos considerados mais desfavoráveis nas enzimas de biotransformação das aminas heterocíclicas (Lin *et al.*, 2012).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são produtos da combustão incompleta de material orgânico (Phillips, 1999), podendo aparecer nos alimentos por se formarem no decurso da sua confeção a temperaturas elevadas (peixe e carne grelhados) ou da sua conservação (alimentos fumados), ou por ocorrerem naturalmente no ambiente como contaminantes (cereais, legumes, pescado) (Fergusun *et al.*, 1996). Segundo a Organização Mundial da Saúde, dentro do grupo dos HAP, há 13 compostos que são claramente carcinogénicos e genotóxicos (WHO, 2005). O mecanismo de toxicidade dos HAP dá-se pela formação de produtos intermediários reativos, responsáveis pelos efeitos mutagénicos/carcinogénicos (Falahatpisheh *et al.*, 2004; Varlet *et al.*, 2007). Estudos epidemiológicos associam a exposição de misturas de HAP contendo benzo(a)pireno ao risco aumentado de desenvolver cancro de pulmão e outros tumores. Também foi observado maior frequência de cancro de estômago em populações que consomem tradicionalmente grandes quantidades de produtos cárneos fumados (Kazerouni *et al.*, 2001; Falahatpisheh *et al.*, 2004).

As N-nitrosaminas são compostos que têm sido reconhecidos como compostos mutagénicos e potencialmente cancerígenos. Estes compostos podem ser encontrados numa ampla variedade de alimentos, incluindo carnes processadas, como bacon, presunto e enchidos, peixe fumado e certos queijos (Ferguson e Philpott, 2008). Estes compostos podem, igualmente, ser sintetizados endogenamente no estômago a partir de nitrito e de aminas secundárias e terciárias existentes nos alimentos (AICR-WCRF, 2007). As N-nitrosaminas requerem ativação metabólica para exercerem sua ação mutagénica e carcinogénica. A etapa inicial da biotransformação envolve uma hidroxilação do carbono do grupo alquila, catalisada pelos citocromos P450 formando um aldeído ou cetona e uma nitrosamina primária, instável, a qual, por sua vez, acaba alquilando sítios nucleofílicos do DNA e do ácido ribonucleico (RNA). Esta etapa é considerada fundamental no processo de iniciação do cancro, (Tricker e Preussmann, 1991) sendo que o fígado é o principal órgão de biotransformação das nitrosaminas, mas outros tecidos humanos também as podem biotransformar (Järgestad e Skog, 2005).

A acrilamida pode formar-se naturalmente em alimentos ricos em açúcares e cozinhados a temperaturas elevadas, como resultado das reações de Maillard, ou seja, como resultado das reações não enzimáticas que ocorrem entre açúcares e aminoácidos a temperaturas elevadas. Embora seja claramente um carcinogénico animal e uma neurotoxina, a extrapolação dos efeitos em sistemas celulares e em animais para os efeitos em humanos tem sido controversa (Exon, 2006). Diversos estudos apontam no sentido da acrilamida poder interferir com os mecanismos de reparação do DNA (AICR-WCRF, 2007).

2.5.2. Antimutagêneos alimentares

O modo de ação dos agentes antimutagênicos podem dividir-se em dois mecanismos principais: atuação direta sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo a sua ativação metabólica ou sequestrando moléculas reativas, e os que atuam sobre o processo que leva a indução de mutações ou sobre a reparação das lesões causadas no DNA (Kada *et al.*, 1978).

Os estudos com os agentes antimutagênicos foram iniciados nos anos cinquenta, estes estudos centram-se na identificação de antimutagêneos, principalmente os de origem natural. A identificação de agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos em alimentos é indispensável e extremamente importante na busca de estratégias para a prevenção do cancro, por meio de modificações dos hábitos alimentares (Wargovich, 1997). Grandes progressos foram feitos desde meados da década de 1990 na compreensão do processo de cancerigênese, havendo crescentes evidências que mostram ou sugerem que a alimentação esteja profundamente relacionada com este processo (AICR- WCRF, 2007).

As mutações podem ser relacionadas com a ausência de alguns componentes alimentares, especialmente micronutrientes (Fenech e Ferguson, 2001). A dose diária recomendada (recommended dietary allowances- RDA), indica a quantidade de um nutriente por dia que é necessário para a maioria das pessoas se manter saudável, estes valores são atualizado periodicamente para refletir novos conhecimentos. Muitos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam sequestrando EROs, quando administrados com o agente que induz as mutações no DNA.

A vitamina E aparece nos alimentos predominantemente como α -tocoferol. Os tocoferóis são encontrados em grandes concentrações no germe de trigo, amêndoas e avelãs, óleos vegetais como os extraídos do germe de trigo, girassol, caroço de algodão, dendê, amendoim, milho e soja. Uma das principais funções atribuídas à vitamina E é a proteção que confere às membranas celulares contra a destruição oxidativa, talvez atuando em conjunto com pequenas moléculas e enzimas para defender as células contra os danos causados pelos radicais de oxigênio. Assim, a vitamina E possui propriedades antioxidantes (Mccall *et al.*, 1989).

O selênio é um elemento essencial para o ser humano pois foi demonstrada a sua incorporação na glutathione peroxidase (GPX), enzima vital na proteção de membranas celulares e subcelulares contra a agressão por peróxidos solúveis. Do ponto de vista biológico, o selênio é um elemento necessário para a produção de enzimas fundamentais na neutralização de radicais livres e na proteção contra a peroxidação lipídica de membranas celulares e subcelulares. Age em sinergismo com a vitamina E na sua função antioxidante. Também está envolvido nas funções da tireoide, além das

funções vitais. O selênio está presente na maioria dos alimentos com grande quantidade de proteínas como: aipo, atum, brócolos, cebola, cereais integrais, fígado, frango, frutos do mar, gema de ovo, germe de trigo, leite pepino e repolho (Olken, 1994).

Os carotenóides são corantes naturais presentes nas frutas e vegetais (cenouras, tomates, espinafre, laranjas, pêssegos, etc.), sendo que sua estrutura química é composta por ligações duplas conjugadas, que são responsáveis pela sua cor e por algumas de suas funções biológicas. Diversos estudos revelam a existência de uma relação entre o aumento do consumo de alimentos ricos em carotenóides e a diminuição no risco de várias doenças. Estes revelam que os carotenóides sequestram o oxigênio singlete, desativam espécies radicalares, modelam o metabolismo dos cancerígenos, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre as células e elevam a resposta imunitária. (Olson, 2004). Os carotenoides como o betacaroteno, licopeno, zeaxantina e luteína, exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas (Hickey *et al.*, 1997).

Os folatos são micronutrientes que existem essencialmente em vegetais de folhas verdes e tem sido sugerido que o seu consumo possa diminuir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de vários tipos de cancro (Stahl e Sies, 1997). Existem estudos que mostram que a deficiente ingestão deste micronutriente provoca um nível de danos no DNA comparável ao que é causado por uma dose elevada de radiação (Courtemanche *et al.*, 2004). Os mecanismos pelos quais a deficiência de folato pode influenciar a carcinogénese parecem envolver o aumento dos erros na replicação de DNA e a hipermetilação de genes de reparação de DNA ou de genes supressores de tumor (Shrubsole *et al.*, 2001).

As fibras alimentares podem ser consideradas antimutagêneas alimentares uma vez que reduzem a concentração de compostos mutagênicos no intestino, bem como o seu tempo de permanência, diminuindo o tempo de exposição da mucosa intestinal a esses compostos e reduzindo a possibilidade da sua absorção. Mais ainda, estas fibras podem adsorver compostos mutagênicos, como, por exemplo, as aminas heterocíclicas, impedindo, também desta forma, a sua absorção (Ferguson, 2001).

Diversos trabalhos têm demonstrado que os polifenóis apresentam capacidade antimutagénica que pode manifestar-se através de diferentes mecanismos. Assim, diversos polifenóis têm mostrado inibir a absorção de mutagêneos como o benzo(a)pireno ou inibir a formação gástrica de *N*-nitrosaminas, podendo, por isso, o estômago ser o principal local onde os polifenóis previnem a cancerogénese. Mais ainda, certos polifenóis parecem influenciar a atividade de enzimas de reparação do DNA através da modelação da expressão dos seus genes, inibir a ação de enzimas oxidativas e desativar espécies oxidativas. Além do já referido, alguns flavonoides, e outros compostos fenólicos,

obtidos através da dieta podem inibir citocromos P450 específicos envolvidos na bioativação de cancerígenos e proteger contra mutagénese através deste mecanismo (Ferguson, 2001).

2.6. Efeitos dos polifenóis na saúde

Numerosos são os estudos analíticos realizados na determinação, distribuição e quantificação de compostos polifenóis em frutas, leguminosas e bebidas. As concentrações destes compostos variam de acordo com as numerosas variedades, os fatores ambientais e tecnológicos, alguns dos quais podem ser controlados para otimizar o conteúdo de polifenóis nos alimentos. É de todo o interesse a identificação das variedades de plantas mais ricas em polifenóis, melhorar os seus métodos de cultivo e limitar as perdas durante o decurso do seu processamento industrial e na cozinha (Manach *et al.*, 2004).

A importância de ingerir alimentos com elevado teor em polifenóis prende-se com as evidências epidemiológicas que apontam no sentido da ingestão insuficiente destes compostos bioativos poder constituir uma componente de risco para o desenvolvimento de doenças crónicas não transmissíveis, entre as quais se encontram as doenças cardiovasculares e o cancro (Holst e Williamson, 2008; Bastos *et al.*, 2009). Com efeito, os polifenóis presentes na dieta têm sido associados com a promoção da saúde através de efeitos que compreendem a diminuição dos níveis de açúcar no sangue, a redução o peso corporal, atividade antimutagénica/anti carcinogénica, anti-inflamatória, anti envelhecimento, antitrombótica, antimicrobiana e, principalmente, atividade antioxidante (Ferguson, 2001; Scalbert *et al.*, 2005; Bernal *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade de diferentes polifenóis para inibirem as enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, potentes mediadores da resposta inflamatória (Anjo, 2004), contribuindo, assim, para a diminuição desta resposta e conferindo, deste modo, proteção contra uma diversidade de patologias nas quais a inflamação pode desempenhar um papel importante, tais como, por exemplo, a aterosclerose e o cancro (Leighton e Urquiaga, 2007; Moraes e Locatelli, 2010).

Diversos estudos sugerem que os compostos fenólicos sugerem que os efeitos benéficos dos polifenóis sobre a saúde possa resultar de outros mecanismos diferentes das suas capacidades antioxidantes e anti-inflamatórias. Dentro desses outros mecanismos encontram-se a modelação da atividade de diferentes enzimas como as telomerasas ou as enzimas de biotransformação, interações com recetores celulares e com vias de transdução de sinal e ainda a regulação do ciclo celular, mecanismos essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos (D' Archivio *et al.*,

2007). Os polifenóis estão ainda envolvidos na regeneração das vitaminas antioxidantes, como, por exemplo, a vitamina E, a vitamina C e a vitamina A (Araújo *et al.*, 2005).

Um estudo recente, e o primeiro destes ensaios realizado *in vivo*, teve o propósito de avaliar o possível efeito pré-biótico dos polifenóis na flora intestinal humana (Queipo-Ortuño *et al.*, 2012). Neste estudo, que envolveu a participação de 10 homens saudáveis, foi possível observar mudanças significativas na microbiota fecal de todos os participantes, tendo os polifenóis revelado capacidade para inibir o crescimento de bactérias prejudiciais, como algumas estirpes de *Clostridium*, e potenciado o crescimento de bactérias pró bióticas, como a *Bifidobacteria*, implicadas na redução de bio marcadores inflamatórios (proteína C reativa) e da concentração de colesterol, promovendo deste modo benefícios para o hospedeiro (Queipo-Ortuño *et al.*, 2012).

As mesmas propriedades que determinam a atividade antioxidante dos compostos fenólicos podem ser responsáveis por eventuais efeitos nefastos. Assim, em determinadas condições, como, por exemplo, na presença do óxido nítrico (NO), ou quando em doses elevadas, e em determinados tecidos, os polifenóis podem oferecer mais riscos oxidativos do que benefícios antioxidantes (Ferguson, 2001; Behling *et al.*, 2004). Com efeito, os polifenóis podem reduzir o ferro (III) a ferro (II) e, assim, gerar radicais hidroxilo através da reação de Fenton. Os polifenóis podem ainda ser reduzidos a quinonas e entrar em ciclos redox originando a produção de ERO ou podem, no decurso da sua regeneração, gerar radicais secundários reativos capazes de oxidar proteínas e lípidos (Ferguson, 2001). Embora alguns ensaios *in vivo*, realizados em animais de laboratório, atribuam efeitos pró-carcinogénicos a alguns flavonoides, a maioria destes ensaios apontam no sentido destes compostos terem uma atividade anticancerígena. É possível que as enzimas de biotransformação possam desempenhar um papel importante na limitação dos efeitos mutagénicos dos polifenóis *in vivo* (Scalbert *et al.*, 2005).

Outro efeito negativo que os compostos fenólicos podem exercer no organismo reside no fato destes poderem ser potencialmente anti nutricionais. Esta propriedade pode dever-se à sua capacidade de quelação de metais, como, por exemplo, o ferro ou o cálcio, e de ligação a aminoácidos e proteínas no trato gastrointestinal. O consumo elevado destes compostos pode estar, assim, relacionado com uma redução da biodisponibilidade destes nutrientes e consequente perda de valor biológico dos alimentos (Ferguson, 2001; Ross e Kasum, 2002).

As atividades biológicas dos compostos fenólicos são influenciadas pelas suas características estruturais, pela natureza do alvo biológico, pelas condições ambientais, como por exemplo o pH dos tecidos, pela dosagem ingerida, bem como pela biodisponibilidade destes compostos no organismo (Behling *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005). Existem evidências, embora indiretas, da absorção do ácido clorogénico e de outros compostos fenólicos, uma vez que existem ensaios em humanos em que se

observara um aumento na capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos nestes compostos (Manach *et al.*, 2005).

Um melhor conhecimento da biodisponibilidade é essencial para a investigação os efeitos na saúde dos polifenóis, qualquer que seja a abordagem usada. Vários fatores alteram a biodisponibilidade de compostos bioativos presentes nos alimentos: a complexidade da matriz alimentar, a forma química do composto de interesse, a estrutura e quantidade de outros compostos ingeridos simultaneamente (fatores exógenos) e ainda o tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolismo do composto e grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microflora intestinal e o perfil genético do indivíduo (fatores endógenos) (Scholz e Williamson, 2007; Crozier *et al.*, 2009). Avaliados em conjunto, estes fatores respondem pelas variações intra e inter-individuais na biodisponibilidade de uma determinada substância (Holst e Williamson, 2008).

Os polifenóis têm biodisponibilidade limitada e podem ser extensamente metabolizados. No entanto, apesar desta limitada disponibilidade, estudos efetuados em humanos sugerem que mesmo essa pequena quantidade que é absorvida possa ser suficiente para exercer efeitos benéficos na saúde (Ferguson, 2001; Williamson e Manach, 2005).

A biodisponibilidade difere grandemente entre os vários tipos de polifenóis sendo o ácido gálico e as isoflavonas os que parecem ser mais bem absorvidos, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina, sendo as proantocianidinas, as catequinas galato do chá e as antocianinas os polifenóis de mais difícil absorção (Manach *et al.*, 2005). No entanto, a determinação da taxa de absorção destes compostos, e, em particular, da taxa de absorção das antocianinas, pode vir subestimada dada a possibilidade deles serem rapidamente convertidos a metabolitos que ainda não tenham sido identificados (Manach *et al.*, 2005).

Apesar das antocianinas terem uma limitada absorção em mamíferos, ensaios realizados com ratos, mostram se conseguem obter concentrações plasmáticas destes compostos dentro da gama em que estes exercem as suas atividades antioxidantes *in vitro* (Passamonti *et al.*, 2003).

A metabolização pela flora intestinal pode, igualmente, ter um efeito preponderante na biodisponibilidade dos polifenóis. Com efeito, os polifenóis que não forem absorvidos no trato gastrointestinal, podem ser metabolizados por estas bactérias, originando metabolitos passíveis de ser absorvidos no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea. Por exemplo, as proantocianidinas têm demonstrado alguns efeitos em ensaios epidemiológicos embora se saiba que a sua absorção intestinal seja muito reduzida. Desta forma, é possível que os efeitos biológicos associados a estes compostos resultem de algum metabolito formado no decurso da sua metabolização pelas bactérias da flora intestinal (Williamson e Manach, 2005).

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização das amostras de mirtilo

Na realização deste trabalho foram analisadas as variedades de mirtilo *Northern Highbush* Earlyblue, Patriot, Bluecrop e Duke e a variedade *Southern highbush* O'Neal, produzidas na zona geográfica abrangida pela cooperativa de Sever do Vouga, Mirtilusa (Sociedade de Produtores Hortofrutícolas). As variedades foram fornecidas pela Mirtilusa no estado de maturação em que as bagas são, normalmente, comercializadas, ou seja, no estado de plena maturação quando os frutos se apresentam com a totalidade da coloração desenvolvida mas sem perda de turgescência.

A colheita foi sempre efetuada de manhã tendo cada amostra sido composta por aproximadamente 300 g de cada cultivar, de entre três a seis plantas de cada genótipo. Depois de colhidas, as amostras foram transportadas em saco térmico até à Faculdade de Ciências e Tecnologia (Campus da Caparica) no escuro, sob refrigeração, tendo sido preparadas para análise (realização dos extratos) num no prazo máximo de duas horas.

3.2. Reagentes e meios de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: acetato de amónio (Riedel-de Haën, 98%); acetato de sódio tri-hidratado (Panreac, 99%); ácido L (+) ascórbico (Panreac, 99%); ácido cítrico mono-hidratado (JMGS, 99,8%); ácido clorídrico (Panreac, 37%); ácido gálico (Merck, 99,5%); 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)di-hidrocloreto (AAPH) (Sigma-Aldrich, 97%); azul de nitrotetrazólio (NBT²⁺) (Sigma); Bacto agar (Becton Dickinson and Company); biotina (Sigma-Aldrich, 99%); carbonato de sódio (VReis); cloreto de cobre (II) bi-hidratado (Riedel-de Haën, 99%); cloreto de ferro (III) hexa-hidratado (Merck, 99%); cloreto de potássio (Panreac, 99%); cloreto de sódio (Panreac, 99,5%); di-hidrogenofosfato de sódio (Panreac, 98%); dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%); etanol (Riedel-de Haën, 99%); fluoresceína (Sigma-Aldrich); D-glucose monohidratada (Panreac); hidrogenofosfato de dipotássio (Becton Dickinson and Company, 97,5%); hidróxido de sódio (Merck, 99%); histidina (Merck, 99%); meio de cultura Nutrien Broth (NB) n°2 (Oxoid); metanol (Riedel-de Haën, 99,8%); metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%); neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) (Sigma); peróxido de hidrogénio (Panreac, 30%); reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac); sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Panreac, 99%); sal dissódico de ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-dissulfónico (ferrozina) (Sigma-Aldrich); sulfato de magnésio heptahidratado (Merck, 99,5%); sulfato ferroso hepta-hidratado (Riedel-de Haën, 99%); *tert*-butil hidroperóxido (t-BHP) (Sigma-Aldrich, 70% em H₂O); 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fluka, 99%); hidrogenofosfato de amónio e sódio tetra-hidratado (NaNH₄HPO₄.4H₂O) (Sigma, 99%) e trolox

(Acros Organics, 97%). Na preparação de todas as soluções, diluições e meios de cultura, utilizou-se água ultrapura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

3.3. Preparação dos extratos de mirtilo

De acordo com Smith e colaboradores (2000), a melhor estratégia de armazenamento dos extratos é mantê-los no escuro a baixas temperaturas, separados em alíquotas, de forma a retirar apenas a quantidade necessária a cada ensaio. Assim, em todos os passos realizados até à obtenção dos extratos, separação em alíquotas e realização dos ensaios, foi minimizado o contacto com a luz, oxigénio e temperaturas elevadas.

Os extratos foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Connor e colaboradores (2002), com pequenas adaptações. Assim, aos mirtilos previamente triturados foi adicionado metanol acidificado com ácido clorídrico (0,1% volume/volume) e arrefecido em gelo, numa proporção de 10 g de fruto por cada 20 mL de solvente. A mistura foi agitada em gelo durante 20 minutos e filtrada, por gravidade, através de um filtro de papel (Watman – Lote EW0287-1; Ref. N° 10311612). Repetiu-se a extração, a partir dos resíduos recuperados do papel de filtro, usando igual volume de metanol acidificado, nas mesmas condições. O filtrado total recuperado foi diluído a 50 mL, num balão volumétrico, com o solvente da extração. Os extratos assim obtidos foram evaporados em rotavapor (Büchi R-200), utilizando-se um banho termo estatizado a 37 °C (Büchi heating bath B-490), até à evaporação total do metanol. Os extratos secos foram ressuspensos em 50 mL de água ultrapura, em balão volumétrico, ficando com uma concentração final de 0,20 g/mL. Os extratos foram filtrados em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar) através de membranas estéreis Millipore Millex GP com poro de 0,22 µm. Depois de esterilizados, os extratos foram distribuídos em alíquotas de 1,5 mL em tubos de polipropileno estéreis e congelados a -50 °C (UltraCongelador New Brunswick Scientific U410).

3.4. Determinação dos fenóis totais pelo Método de Folin-Ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu baseia-se na redução a pH alcalino do heteropolianião molibdotungstênio-fosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu, efetuada pelos compostos fenólicos, na forma de íon fenolato, da amostra e que origina o aparecimento de um produto azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005). Este método é simples, sensível e preciso mas pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam, igualmente, reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu como, por exemplo, adenina, adenosina, alanina, ácido

aminobenzóico, ácido ascórbico, benzaldeído, cisteína, creatinina, histamina, histidina, índole, frutose, sacarose, sulfito de sódio, sulfato de ferro e outros (Prior *et al.*, 2005).

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Kosar e colaboradores (2008) com algumas modificações. Assim, em balões volumétricos de 10 mL, contendo cerca de 6 mL de água ultrapura, adicionou-se 100 µL de cada extrato, ou das suas diluições, e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição. Deixou-se um minuto à temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume) e perfez-se o volume a 10 mL com água ultrapura. As misturas assim preparadas foram incubadas durante 2 horas, a 25 °C e no escuro. Findo este tempo, procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água ultrapura.

Todas as amostras foram analisadas em quadruplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e os 500 mg/L.

Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 grama de peso fresco de amostra (por 100 grama de fruto).

3.5. Quantificação das antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial

Este método baseia-se na transformação estrutural reversível em função do pH que as antocianinas monoméricas sofrem (Figura 3.1) que leva à obtenção de diferentes espectros de absorção (Figura 3.2). Assim, a pH 1, a forma predominante é a de oxónio colorido ($\lambda_{\text{max-vis}}$ 520 nm) enquanto a pH 4,5 a forma predominante é a de hemiacetal sem coloração (sem absorção a 520 nm).

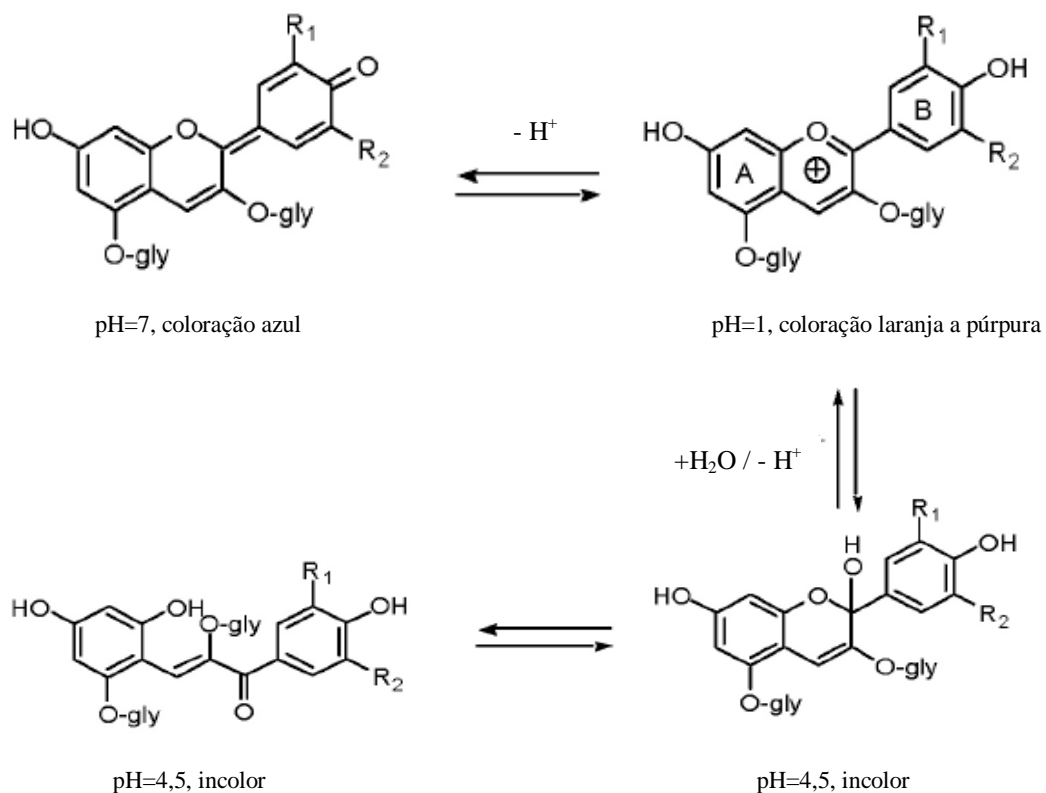


Figura 3.1 - Formas estruturais predominantes de antocianinas a diferentes valores de pH (Lee *et al.*, 2005).

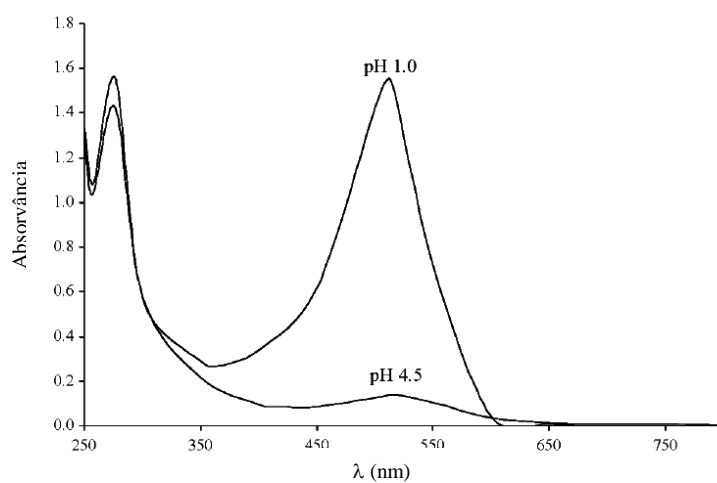


Figura 3.2 - Características espectrais das antocianinas em soluções a pH 1,0 e a pH 4,5 (Lee *et al.*, 2005).

O método do pH diferencial permite medir, com rapidez e precisão, o total de antocianinas, mesmo quando em presença de pigmentos polimerizados e de outros compostos interferentes, uma vez

que estes não sofrem a mesma alteração de absorção em função do pH. A diferença de absorção a 520 nm de um extrato a pH 1 e a pH 4,5 é então proporcional à quantidade de antocianinas totais.

A determinação das antocianinas totais foi efetuada de acordo com o método descrito por Lee e colaboradores (2005). Assim, os extratos foram diluídos numa solução de cloreto de potássio 0,025M, acidificada com ácido clorídrico até pH 1, até que a absorvância a 520 nm das soluções ficasse dentro da zona linear do espectrofotómetro (SPEKOL 1500) (entre 0,2 e 1), para que não fosse excedida a capacidade tampão dos reagentes, a percentagem de amostra na solução final nunca foi superior a 20%. Procedeu-se à mesma diluição dos extratos utilizando uma solução tampão de acetato de sódio 0,4 M a pH 4,5. Deixaram-se estabilizar as soluções durante 20 minutos e leu-se a absorvância no referido espectrofotómetro a 520 nm e a 700 nm, utilizando água ultrapura como branco. A leitura a 700 nm foi feita com o objetivo de eliminar possíveis interferências de alguns materiais uma vez que a este comprimento de onda as antocianinas não absorvem.

As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo o teor em antocianinas no extrato, expresso em mg equivalentes de cianidina-3-glucósido, sido determinado recorrendo à seguinte expressão:

$$\text{mg equivalentes/L} = (A \times MM \times FD \times 10^3) / \epsilon \times d$$

Sendo que: A corresponde a $[(A_{520}-A_{700})_{\text{pH1}}-(A_{520}-A_{700})_{\text{pH4,5}}]$; MM é a massa molar da cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol); FD é o fator de diluição determinado; 10^3 o fator de conversão de g para mg; d o percurso ótico (1 cm) e ϵ o coeficiente de absorvidade molar da cianidina-3-glucósido ($26900 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Lee *et al.*, 2005).

Os resultados finais foram expressos em mg de equivalentes de cianidina-3-glucósido por 100 gramas de peso fresco de amostra.

3.6. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix)

O grau Brix indica a percentagem de sólidos solúveis no sumo do fruto. Nos mirtilos, este parâmetro pode ser influenciado por vários fatores nos quais se incluem, a variedade, região de cultivo, fatores climáticos e estado de maturação (Türkmen e Eksi, 2011). Cada grau Brix corresponde a 1g de sólidos solúveis/açúcares por 100 g de sumo. A determinação do grau Brix é usada como referência de ponto de colheita e consumo para a maioria das frutas, especialmente para as não-climáticas.

O sumo extraído de 5 bagas de cada cultivar foi utilizado para determinar a concentração de sólidos solúveis, através de um refratômetro manual, com correção de temperatura, Modelo EUROMEX – 5532 (0-32%), sendo o resultado expresso em percentagem (grau Brix).

3.7. Avaliação da Capacidade Antioxidante

3.7.1. Determinação da capacidade de quelação de Fe(II)

A ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-sal dissulfônico de sódio) pode formar complexos de cor vermelha com os íons Fe^{2+} , $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4-}$, apresentando estes complexos um máximo de absorção a 562nm. Na presença de agentes quelantes, a formação desses complexos é dificultada, resultando numa diminuição da coloração vermelha característica. As medições da diminuição da coloração, através da medição da diminuição da intensidade da absorção a 562 nm, permitem efetuar uma estimativa da capacidade de quelação do ferro da amostra (Geckil *et al.*, 2005).

A capacidade de quelação de ferro foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Geckil e colaboradores (2005). Assim, as misturas reacionais foram preparadas misturando diferentes volumes de amostra, ou de suas diluições, com 50 μL de uma solução $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mM). Após uma incubação de cinco minutos à temperatura ambiente adicionaram-se 200 μL de ferrozina (5 mM), ajustou-se o volume a 2000 μL com água, agitou-se vigorosamente a mistura obtida e incubou-se durante 10 minutos, também à temperatura ambiente. Terminada esta segunda incubação, leu-se a absorvância a 562 nm no espectrofotômetro (SPEKOL 1500). Realizaram-se igualmente um controlo negativo, substituindo a amostra por igual volume de água ultrapura (solvente da amostra), e um controlo de interferência da cor da amostra, utilizando igual volume de amostra e completando a 2000 μL com água ultrapura.

As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a percentagem de inibição da formação dos complexos $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4-}$ sido calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(Abs_{\text{controlo negativo}}) - (Abs_{\text{amostra com ferrozina}} - Abs_{\text{amostra sem ferrozina}}) / (Abs_{\text{controlo negativo}})] \times 100$$

3.7.2 Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP (“Ferric Reduction Antioxidant Power”)

O ensaio FRAP baseia-se na determinação da capacidade da amostra para reduzir o Fe(III) a Fe(II), medindo assim a sua capacidade redutora. Quando o Fe(III) do complexo de Fe(III)-tripiriditriazina (Fe^{3+} -TPTZ) é reduzido a Fe(II) forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul suscetível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm e que é proporcional à quantidade de espécies redutoras (mecanismo antioxidante SET) presentes na amostra (Figura 3.3) (Benzie e Strain, 1996).

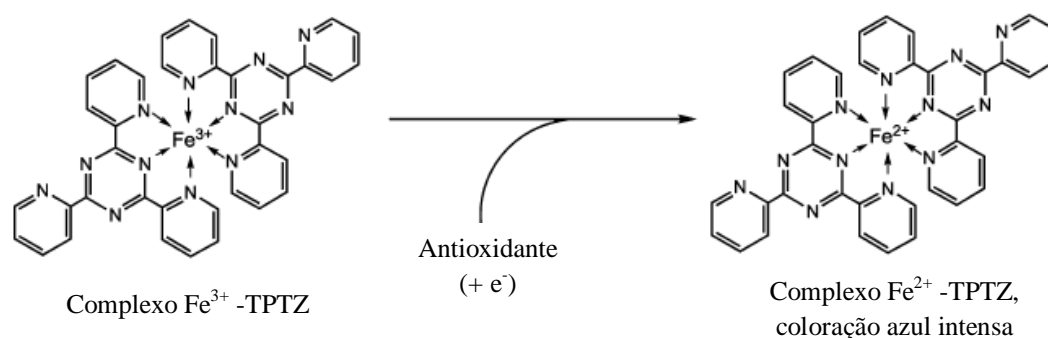


Figura 3.3 - Formação do complexo (Fe^{2+} -TPTZ) após redução do Fe^{3+} por um antioxidante (adaptado de Moon e Shibamoto, 2009).

Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método descrito por Ramful e colaboradores (2010) com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado no momento da utilização, adicionando 25 mL de tampão acetato 0,25 M (pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (10 mM) em HCl (40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM). O ensaio iniciou-se com a adição, num tubo de ensaio, de 3,0 mL do reagente FRAP, preparado de fresco e pré-aquecido a 37°C, com 300 μL de água e 100 μL de cada um dos extratos. As misturas foram incubadas no escuro durante 4 minutos a 37°C. Durante esta incubação foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

A diferença entre a absorvância da amostra e a absorvância do branco foi determinada e usada para calcular o valor de FRAP. As amostras foram analisadas em quadruplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já

descrita para as amostras, mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0 e os 1,25 mM. Os resultados foram expressos em mmol de Fe^{2+} /por 100 grama de peso fresco de mirtilo.

3.7.3. Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC (“Cupric Reducing Antioxidant Capacity”)

O ensaio CUPRAC consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) por ação de redutores (antioxidantes) presentes numa amostra. Ao contrário da forma oxidada (Cu(II)-neocuproína), a forma reduzida do complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm (Figura 3.4). Assim, a redução da forma oxidada deste complexo (Cu(II)-neocuproína) pelos compostos da amostra pode ser determinada espectrofotometricamente através da leitura da absorvância a 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

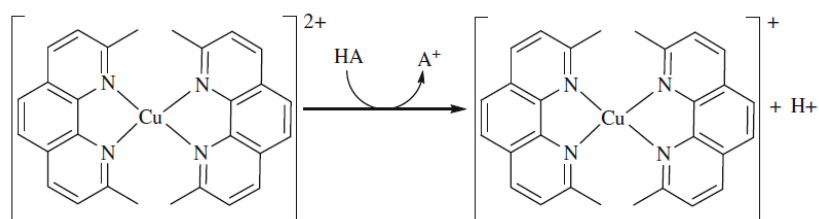


Figura 3.4 - Redução do complexo Cu(II)–neocuproína a Cu(I)–neocuproína, por ação de uma molécula antioxidante (HA) originando uma molécula de antioxidante oxidada (A^+). Os prótons libertados na reação são neutralizados numa solução tampão de acetato de amónio (Gülçin, 2012).

A realização do ensaio CUPRAC foi efetuada de acordo com o método descrito por Apak e colaboradores (2004) com algumas adaptações. Assim, num tubo de ensaio juntou-se 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, acetato de amónio 1M, neocuproína 7,5 mM em etanol. Em seguida, adicionou-se 50 μL de amostra e completou-se a 4100 μL com água. Os tubos foram incubados ao abrigo da luz durante 1 hora à temperatura ambiente procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotómetro SPEKOL 1500) a 450 nm, utilizando como branco a mesma mistura com 1,1 mL de água ultrapura em vez da amostra. As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por 1,1 mL das

soluções padrão de ácido ascórbico (15,625; 31,25; 62,5; 125; e 250 µM). Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de ácido ascórbico por 100 grama de peso fresco de mirtilo.

Em relação aos ensaios de redução do ferro, o CUPRAC tem a vantagem de conseguir detetar antioxidantes do tipo tiol (glutathiona, cisteína, etc.). Por outro lado o facto do potencial redox para o par Cu(II)-neocuproína /Cu(I)-neocuproína ser inferior ao do Fe(III)/Fe(II) com os respetivos ligandos do FRAP faz com que determinados compostos, tais como açúcares simples ou o ácido cítrico não possam ser reduzidos no CUPRAC podendo-o ser no FRAP. O método é rápido e não necessita de aparelhos muito sofisticados, sendo a reação relativamente insensível ao ar, luz, humidade ou pH (Apak *et al.*, 2004).

3.7.4. Determinação do sequestro do peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio apresenta um máximo de absorção a 230 nm. Desta forma, a percentagem de sequestro deste composto pode ser determinada pela diminuição da absorvância a 230 nm de uma solução de peróxido de hidrogénio na presença de amostra, por comparação com um branco (Magalhães *et al.*, 2008; Esmaili e Sonboli, 2010).

A percentagem de sequestro do peróxido de hidrogénio foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Esmaili e Sonboli (2010). Assim, em tubos de ensaio, misturaram-se 400 µL de extrato e 4,6 mL de solução 10 mM de H₂O₂ preparada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A mistura foi incubada, no escuro, durante 30 minutos, a 25°C. Findo o período de incubação, leu-se a absorvância das soluções num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 230 nm, utilizando cuvetes de quartzo. Para cada uma das amostras foi preparado um branco com o mesmo volume de cada um dos extratos e 4,6 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), sem peróxido de hidrogénio. Foi ainda preparado um controlo para o ensaio, com 400 µL de água ultrapura e 4,6 mL da solução de H₂O₂ em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a percentagem de sequestro de H₂O₂ sido calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ sequestro} = [(Abs_{\text{controlo}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco da amostra}}) / (Abs_{\text{controlo}})] \times 100$$

O peróxido de hidrogénio forma-se *in vivo*, no decurso de diversos processos metabólicos, nomeadamente pela ação de diversas enzimas como a glucose oxidase ou a superóxido dismutase. Desta forma uma das vantagens deste ensaio é a de se estudar a capacidade de sequestro de um oxidante com relevância fisiológica.

3.7.5. Determinação do sequestro do radical anião superóxido

O azul de nitrotetrazólio (NBT^{2+}) reage com o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) dando origem ao azul de formazano (Figura 3.5) que possui um máximo de absorção a 560 nm. Desta forma, se à mistura de reação se adicionar um composto com capacidade para captar o $\text{O}_2^{\bullet-}$, passarão a existir, no meio reacional, dois compostos a competir pelo radical anião superóxido, o que se traduz por uma diminuição da extensão da redução do NBT^{2+} , com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Valentão *et al.*, 2001; Magalhães *et al.*, 2008).

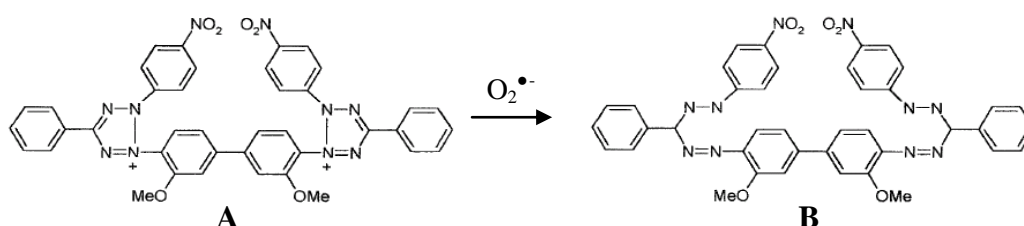


Figura 3.5 - Redução do NBT^{2+} (A) pelo radical anião superóxido, dando origem ao azul de formazano (B).

Neste ensaio o radical anião superóxido é gerado utilizando o sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH em condições aeróbias (Figura 3.6) (Nakamura *et al.*, 1992).

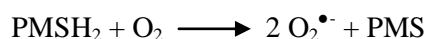
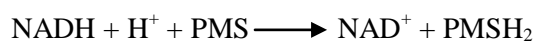


Figura 3.6 - Formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH (Nakamura *et al.*, 1992).

A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada de acordo com o método descrito por Valentão e colaboradores (2001) com pequenas alterações. Assim, em cuvetes do espectrofotômetro adicionaram-se 200 μL de cada uma das amostras. Em seguida adicionaram-se 300 μL de NADH 1,66 mM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4), 300 μL de NBT^{2+} 430 μM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) e por fim tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) para completar a 2 950 μL . A reação iniciou-se com a adição de 50 μL de PMS 162 μM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) tendo-se acompanhado a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à

temperatura ambiente. A estabilidade do NBT^{2+} em presença das amostras foi verificada, através da observação da estabilidade da absorvância a 560 nm antes da adição do PMS, como forma de garantir que as amostras em si não tinham capacidade de reduzir o NBT^{2+} a formazano. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra (água). As determinações foram realizadas em quadruplicado, no espectrofotómetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do NBT^{2+} de cada uma das amostras foi calculada em relação ao controlo utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ Inibição} = [(\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}} - \text{Variação}_{\text{absorvância da amostra}}) / (\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}}) \times 100]$$

O radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos. Desta forma, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica. Este ensaio pode dar resultados erróneos quando a amostra interfere com o sistema gerador do radical anião superóxido ou quando a amostra reduz diretamente o NBT^{2+} , embora esta última situação possa ser despistada pela observação da estabilidade da absorvância antes da adição do PMS.

3.7.6. Determinação do resgate do radical peroxilo pelo ensaio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)

Este ensaio permite determinar a capacidade da amostra em estudo para sequestrar radicais peroxilo (ROO^{\bullet}) gerados pela decomposição térmica (a 37 °C) do 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH) (Figura 3.7), através da determinação da inibição da oxidação da fluoresceína induzida por estes radicais.

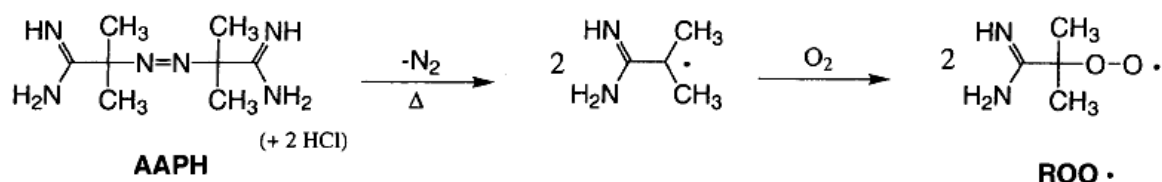


Figura 3.7 - Esquema para a decomposição do AAPH originando radicais peroxilo. Da termodecomposição do AAPH resulta o radical R^{\bullet} que, ao reagir com O_2 , dá origem ao radical ROO^{\bullet} (Dunlap *et al*, 2003).

O radical peróxido oxida a fluoresceína originando produtos não fluorescentes (Figura 3.8). Desta forma a incubação da fluoresceína na presença de uma fonte de radicais peróxido leva a uma diminuição imediata da fluorescência. Quando esta incubação se processa na presença de um antioxidante verifica-se um período de latência antes de se iniciar essa diminuição, sendo que esse período de latência é tanto maior quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra (Ou *et al.*, 2001).

A realização deste ensaio com diferentes concentrações de Trolox permite a construção de uma curva de calibração que relaciona a concentração deste antioxidante com a área sob a curva de decaimento da fluoresceína. Desta forma, sabendo o valor desta área em presença da amostra, é possível avaliar a capacidade de sequestro do radical peróxido pela mesma, expressa em equivalentes de Trolox, por interpolação da respetiva reta de calibração (Ou *et al.*, 2001).

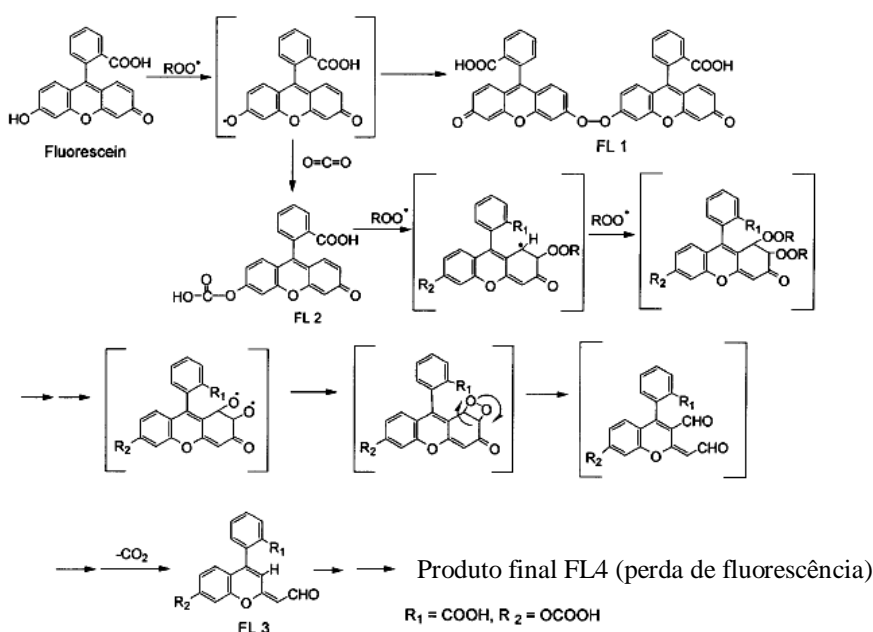


Figura 3.8 – Mecanismos propostos para a oxidação da fluoresceína pelo radical peróxido (Ou *et al.*, 2001).

Para a realização do ensaio ORAC seguiu-se o método descrito por Ou e colaboradores (2001) com algumas modificações, tendo-se efetuado todas as determinações em triplicado. As misturas reacionais compostas por 20 μ L das diferentes amostras diluídas em tampão fosfatos (75 mM, pH 7,4), 20 μ L de diluições de trolox (entre 0,781 e 50 μ M em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) ou, no caso do

branco, 20 µL de tampão fosfatos (75 mM, pH 7,4), e 160 µL de fluoresceína (0,075 µM em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) foram preparadas em microplacas de 96 poços. Após as placas terem sido pré-incubadas durante cinco minutos a 37 °C, iniciou-se a reação com a adição a cada poço de 20 µL de uma solução de AAPH (35,7 g/L em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) pré-aquecida a 37 °C. As placas foram colocadas num leitor de microplacas (Anthos Zenyth 3100) e incubadas a 37 °C, com agitação durante 30 minutos, tendo a fluorescência (λ de excitação = 485 nm e λ de emissão = 535 nm) sido medida em intervalos de 1 minuto.

A área sob a curva (AUC) de decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo foi calculada recorrendo à seguinte expressão (Ou *et al.*, 2001):

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{30}/f_0$$

Sendo f_0 a f_{30} a fluorescência registada no minuto zero (f_0) e nos outros minutos até ao minuto 30.

A atividade antioxidante, expressa em µmol de equivalentes de trolox por grama de peso fresco de mirtilos, foi quantificada por interpolação de uma reta de regressão linear entre os valores das concentrações de trolox e a área sob a curva de decaimento da fluoresceína obtida com as diversas concentrações de trolox testadas, após a subtração da área obtida no ensaio em branco.

3.8. Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do Teste de Ames

O teste de Ames ou “bacterial reverse mutagenicity test”, desenvolvido por Bruce Ames em 1975, deteta o potencial mutagénico de substâncias através da indução da mutação reversa no operão histidina em mutantes de *Salmonella typhimurium* LT2. Este teste é um dos testes de curto termo mais utilizados em toxicologia genética para determinar a mutagenicidade de compostos puros ou de misturas complexas, como, por exemplo, extratos obtidos a partir de alimentos (Maron e Ames, 1983).

O teste de Ames utiliza estirpes de *Salmonella typhimurium* com diferentes mutações em vários genes do operão histidina, e que, por isso, se encontram impedidas de sintetizar este aminoácido (his^-). Quando estas estirpes crescem num meio de cultura sem histidina (meio mínimo contendo apenas sais minerais e uma fonte de carbono e azoto), apenas uma pequena percentagem de células, característica de cada estirpe, é capaz de reverter espontaneamente a mutação e tornar-se prototrófica para a histidina (his^+), conseguindo, por isso, crescer e formar colónias. A exposição destas estirpes a agentes mutagénicos conduz a um aumento da taxa de reversão da mutação e, consequentemente, a um aumento do número de células prototróficas para a histidina. Assim, quando um mutagénico é

adicionado ao meio, o número de revertentes aumenta proporcionalmente à dose de mutagêneo utilizado (revisto em Mortelmans e Zeiger, 2000).

A realização do teste consiste em adicionar uma quantidade fixa de bactérias (cerca de 10^8) com quantidades variáveis do composto a testar e em plaquear estas misturas em meio de cultura contendo uma quantidade mínima e limitante de histidina (geralmente 0,05 mM). As placas são incubadas a 37 °C, durante 48 horas, sendo, então, contado o número de colônias de revertentes. A baixa concentração de histidina no meio permite que as bactérias se dividam um número limitado de vezes, de modo a que as lesões que tenham ocorrido no DNA possam ser fixadas em mutações. Durante o crescimento surge na placa uma turvação característica (“background”) visível a olho nu, que pode funcionar como um indicador de citotoxicidade, uma vez que a sua ausência indica que o composto em estudo levou a uma morte celular generalizada. Quando a histidina do meio se esgota, apenas as bactérias que reverteram a mutação, bactérias que passaram a *his*⁺, conseguem continuar a crescer formando colônias isoladas (revisto em Mortelmans e Zeiger, 2000).

Os resultados são expressos em termos de número de revertentes/placa ou número de revertentes/quantidade de substância testada (revisto em Mortelmans e Zeiger, 2000). Um composto é considerado positivo no teste de Ames quando se obtém um efeito consistente de dose-resposta, isto é, quando se observa um aumento do número de revertentes com o aumento da concentração e, simultaneamente, quando para uma das doses estudadas se observa uma duplicação do número de revertentes espontâneos. A atividade mutagénica específica pode ser calculada pelo declive da parte linear da curva de dose-resposta.

3.8.1. Caracterização da estirpe de *S. typhimurium* utilizada

No presente trabalho utilizou-se a estirpe TA100 de *S. typhimurium* gentilmente cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Trata-se de uma estirpe com uma mutação por substituição de base, na qual o códon CTC da estirpe selvagem foi substituída por CCC no alelo *hisG46*. Para além desta mutação no operão da histidina, a estirpe TA100 exhibe outras características genotípicas adicionais que aumentam a sua sensibilidade para a deteção de mutagêneos. Estas mutações adicionais incluem a mutação *rfa*, que causa a perda parcial da barreira lipopolissacárida aumentando a permeabilidade da parede celular bacteriana a moléculas de grande dimensão; A deleção *uvrB*, que corresponde a uma deleção do gene que codifica para uma das enzimas envolvidas no sistema de reparação de DNA por excisão; E a inserção do plasmídeo pKM101, que confere resistência à ampicilina, e que contém os genes de um sistema de reparação errónea, o que permite aumentar a frequência de mutação. A deleção *uvrB* abrange parte do gene que codifica para a biotina, o que torna esta estirpe incapaz de crescer na ausência desta

vitamina. Esta estirpe apresenta um número de revertentes espontâneos que varia entre 150 e 210 (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000).

3.8.2. Realização dos testes de Ames

Para avaliar a atividade mutagénica e antimutagénica dos diferentes extratos de mirtilo estudados, procedeu-se à realização do teste de Ames, na variante de ensaio com pré-incubação, conforme o descrito por Maron e Ames (1983). Foi preferida esta variante, pois ela permite aumentar a sensibilidade do teste, tendo em conta que as bactérias ficam expostas aos compostos em estudo durante algum tempo antes de efetuar a sua diluição na placa de Petri (Maron e Ames, 1983). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

A estirpe TA100 foi inoculada em 5 mL de meio NB, incubada durante 12 a 16 horas, a 37 °C, com agitação (210 rpm) e ao abrigo da luz, numa incubadora orbital, tendo sido mantida ao abrigo da luz e à temperatura de 4 °C até à realização do ensaio.

Para a realização dos ensaios de mutagenicidade, os diferentes volumes dos extratos analisados, entre 0 e 1000 µL, foram misturados com 250 µL de tampão de fosfatos de sódio (0,2 M, pH 7,4) e 100 µL da cultura bacteriana. Para que o volume final em todas as misturas de pré-incubação fosse o mesmo, este foi sempre ajustado com água estéril até ao volume final de 1350 µL. As misturas assim preparadas foram incubadas a 37 °C e 210 rpm, durante 20 minutos numa incubadora orbital. Após a incubação adicionou-se a cada tubo 2 mL de gelose de superfície (“top-agar”) (Tabela 3.1) fundida a 100 °C e arrefecida até 45 °C. Esta mistura foi então agitada e plaqueada em placas de Petri com meio VB (Tabela 3.2). As placas foram incubadas invertidas em estufa a 37 °C durante 48 horas, procedendo-se então à contagem manual das colónias de revertentes *his*⁺ para cada concentração.

Tabela 3.1 - Composição da gelose de superfícies por litro (Maron e Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade / Concentração
Agar	6 g
NaCl	5 g
Histidina	0,05 mM
Biotina	0,05 mM

Na preparação da gelose de superfície a histidina e a biotina foram adicionadas após esterilização da mistura de NaCl e agar, a partir de uma solução estéril e equimolar de histidina e de biotina (0,5 mM). Após esta suplementação a gelose de superfície foi imediatamente distribuída, em alíquotas de 2 mL, por tubos de vidro esterilizados.

Tabela 3.2 - Composição do meio VB (por litro) (Maron e Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade (g)
Glucose	20
Agar	15
K ₂ HPO ₄	10
NaH ₂ NH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O	3,5
Ácido cítrico monohidratado	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2

O meio VB resulta da mistura, após esterilização, de soluções de agar (1,5%), glucose (40%) e de uma solução de sais composta por MgSO₄·7H₂O (10g/L), ácido cítrico monohidratado (100g/L), K₂HPO₄ (500g/L) e NaH₂NH₄PO₄·4H₂O (175g/L).

Nos ensaios de atividade antimutagénica procedeu-se da mesma forma descrita para os ensaios de mutagenicidade, com a diferença que as misturas de pré incubação continham, simultaneamente, um volume fixo (10 µL) de uma solução de t-BHP (10 µg/µL,) preparada de fresco, por diluição em água estéril, a partir da respetiva solução comercial. Esta quantidade corresponde a uma concentração final de 1,11 µmol de t-BHP/placa. A atividade antimutagénica, expressa em percentagem de inibição da mutagenicidade, foi calculada através da seguinte expressão (Yen e Chen, 1995):

$$\% \text{Inibição} = [(RI-RE)-(RIM-RE)] \times 100/(RI-RE)$$

Sendo RI o número de revertentes induzidos pelo mutagénico, RE o número de revertentes espontâneos e RIM o número de revertentes induzidos pelo mutagénico na presença dos extratos em estudo.

3.9. Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos dados foi efetuado utilizando o *software* “Microsoft Office Excel 2007” (Microsoft Corporation, Washington). Nesse sentido foram realizados o teste t, regressões lineares, análises de correlação e análise ANOVA.

4. Resultados e Discussão

A capacidade antioxidante é influenciada pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo binómio tempo-temperatura. No que se refere aos solventes orgânicos, o metanol, por conseguir extrair elevada quantidade de compostos bioativos, tem sido apontado como o mais eficaz (Naczki e Shahidi, 2004). Assim, neste trabalho, foi utilizada uma solução de metanol acidificada como solvente extrator. No entanto, tendo em conta que era também objetivo do estudo avaliar a atividade antimutagénica dos extratos, através da realização do teste de Ames, foi necessário proceder à evaporação do solvente extrator, para posteriormente se ressuspender o resíduo em água ultrapura e esterilizar o extrato aquoso por filtração, em câmara de fluxo laminar, usando membranas estéreis com poro de 0.22 µm.

4.1. Determinação dos fenóis totais

A composição em compostos fenólicos das amostras de mirtilo, preparadas de acordo com o método descrito anteriormente, é apresentada na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Teor de compostos fenólicos totais nas amostras testadas

Amostras	Compostos fenólicos totais (mg eq. ác. gálico/100g de mirtilo)
Patriot	153,4 ^a ± 3,0
Bluecrop	155,7 ^a ± 1,7
Duke	201,1 ^b ± 2,3
Earlyblue	161,0 ^c ± 3,4
O'Neal	147,2 ^d ± 1,5

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05).

Os teores em compostos fenólicos variaram entre 147,2 e 201,1 mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de mirtilo. A variedade que apresentou menor teor em compostos fenólicos foi a O'Neal, seguindo-se as variedades Patriot e Bluecrop, que apresentaram valores semelhantes de acordo com o teste t (p<0,05), de seguida foi a variedade Earlyblue e finalmente, com maior teor em compostos fenólicos totais, a variedade Duke. Todas as amostras apresentaram valores que foram significativamente diferentes de acordo com o teste t, excetuando as amostras das variedades Patriot e

Bluecrop. O fato da variedade O'Neal ter sido aquela com mais baixo teor em polifenóis pode estar relacionado com esta ser a única pertencente ao grupo *Southern Highbush* mais adaptada às condições climatográficas da região sul de Portugal.

Os valores obtidos estão de acordo com os valores apresentados por Koca e Karadeniz (2009) para mirtilos de outras variedades, cultivados na região do mar negro, na Turquia, e com os valores reportados por Ehlenfeldt e Prior (2001) para as mesmas variedades de mirtilos, cultivadas em Nova Jersey, nos Estados Unidos da América. Neste último estudo os valores variaram entre 139 para a variedade O'Neal e 216 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco, para a variedade Duke.

Outros autores descrevem teores de fenóis totais superiores aos obtidos neste trabalho, chegando a ser superiores a 300 mg ácido gálico/100 g de fruto, em cultivares de *V. corymbosum*, e superiores a 500 mg ácido gálico/100 g de fruto em mirtilos selvagens (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt e Prior, 2001; Giovanelli e Buratti, 2009; Koca e Karadeniz, 2009; Bunea *et al.*, 2011; You *et al.*, 2011). Esta variação dos resultados pode ser justificada com a variação das espécies e variedades analisadas, graus de maturação, tipo de solo, condições climáticas e práticas de cultivo (Moyer *et al.*, 2002). Prior e colaboradores (1998), verificaram que com o teor polifenóis totais dos mirtilos aumentava entre 113% e 169% com o aumento do grau de maturação da baga.

4.2. Quantificação das antocianinas monoméricas totais

Os resultados do teor das antocianinas monoméricas totais, expressos em mg de equivalente de cianidina por 100 g de mirtilo, encontram-se na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Teor de antocianinas monoméricas nas amostras testadas

Amostras	Antocianinas monoméricas (mg eq. cianidina/100 g de mirtilo)
Patriot	53,28 ^a ± 0,58
Bluecrop	46,49 ^b ± 0,45
Duke	52,49 ^a ± 0,14
Earlyblue	46,96 ^b ± 0,37
O'Neal	46,14 ^b ± 0,70

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05).

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 4.2, pode constatar-se que o teor em antocianinas monoméricas das amostras de mirtilos das variedades Bluecrop, Earlyblue e O'Neal são significativamente semelhantes de acordo com o teste t ($p < 0,05$), sendo as variedades Patriot e Duke significativamente diferentes das anteriores, mas não significativamente diferentes entre si de acordo com o teste t ($p < 0,05$). Os resultados mostram que as variedades com maior teor em antocianinas monoméricas são a Patriot e a Duke com cerca de 53 mg equivalentes de cianidina por 100 g de mirtilo, seguindo-se as restantes variedades com aproximadamente 46 mg equivalentes de cianidina por 100 g de mirtilo.

Efetuada a razão entre as antocianinas (expressas em mg eq. cianidina/100 g de mirtilo) e os compostos fenólicos (expressos em mg eq. ác. gálico/100g de mirtilo) totais verifica-se que as antocianinas representam entre 26% (Duke) a 35% (Patriot) da concentração de compostos fenólicos presentes nas variedades avaliadas. Os níveis de antocianinas em compostos de fenóis totais estão de acordo com os resultados obtidos entre 23% e 37% no estudo efetuado por Bunea e os seus colaboradores (2011) e por Dragovic-Uzelac e seus colaboradores (2010). Esta análise aponta no sentido das antocianinas contribuírem mais para o total de compostos fenólicos na variedade Patroit, seguido das variedades O'Neal, Bluecrop e Earlyblue e terem o menor peso na variedade Duke.

Os valores de antocianinas obtidos estão de acordo com os valores obtidos, por outros autores, para as variedades Earlyblue e Bluecrop cultivadas em Nova Jersey, nos Estados Unidos da América (Ehlenfeldt e Prior, 2001), ou para a variedade Duke cultivada na Roménia (Bunea *et al.* 2011), sendo, no entanto, os valores obtidos para as restantes variedades analisadas inferiores aos valores reportados por esses mesmos autores. Procurando na literatura verifica-se que o teor em antocianinas apresenta uma grande variação entre as várias variedades de mirtilos colhidas em diferentes zonas e em diferentes condições. Assim este valor varia entre 12,7 e 235,4 mg/100 g fruto nas variedades de *V. corymbosum* (Prior *et al.*, 1998; Sellappan *et al.*, 2002; Giovanelli e Buratti, 2009; Bunea *et al.*, 2011), atingindo valores bastante superiores (cerca de 350 mg eq. cianidina/100 g de mirtilo) no caso dos mirtilos selvagens, em que a própria polpa tem uma coloração avermelhada (Giovanelli e Buratti, 2009; Bunea *et al.*, 2011). Tal como já anteriormente referido em relação às variações encontradas no teor em compostos fenólicos totais também a variação do teor em antocianinas pode dever-se às diferenças genéticas das cultivares, a fatores climáticos e ambientais, tais como, a temperatura, a radiação UV, o tipo de solo ou as técnicas agrícolas aplicadas (Koca e Karadeniz, 2009).

4.3. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix)

Os resultados do teor de sólidos solúveis, expressos em percentagem, obtidos nas diferentes amostras analisadas encontram-se na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Teor de sólidos solúveis (grau Brix) nas amostras testadas

Amostras	Grau Brix (%)
Patriot	10,9 ^a ± 0,7
Bluecrop	10,4 ^a ± 0,6
Duke	11,4 ^{a,b,c} ± 1,0
Earlyblue	11,9 ^b ± 0,4
O’Neal	12,2 ^{b,c} ± 0,6

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

Os valores do teor de sólidos solúveis variaram entre 10,4% para a variedade Bluecrop e 12,2% para a variedade O’Neal. De acordo com o teste t (p<0,05), a variedade Duke não difere significativamente das outras amostras e as amostras das variedades Patriot e Bluecrop diferem significativamente das amostras das variedades Earlyblue e O’Neal. Os teores em sólidos solúveis obtidos encontram-se na gama de valores obtidos por outros autores (entre 10 e 19%) para diversas cultivares de *V. corymbosum* na altura da plena maturação (Prior *et al.*, 1998; Saftner *et al.*, 2008; Giovanelli e Buratti, 2009).

4.4. Determinação da atividade antioxidante das diferentes variedades de mirtilo

Para a caracterização da atividade antioxidante das diferentes variedades de mirtilo em estudo procedeu-se à avaliação da sua capacidade redutora com os ensaios FRAP, CUPRAC, à avaliação da sua capacidade de quelação de metais (capacidade de quelação do ferro (II)), e, por fim, à avaliação da sua capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigénio, nomeadamente do radical anião superóxido, do peróxido de hidrogénio e do radical peroxilo (ensaio ORAC).

4.4.1. Determinação da atividade antioxidante por capacidade redutora da amostra

Os ensaios FRAP e CUPRAC são ensaios que empregam mecanismos de transferência de eletrões (SET). O CUPRAC é um ensaio que se baseia na redução de iões complexos Cu²⁺ para Cu⁺ por ação

de redutores (antioxidantes) presentes numa amostra. O FRAP é um ensaio que se baseia na redução de iões Fe(III) a Fe(II), medindo assim a capacidade redutora da amostra.

4.4.1.1. Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

Os resultados do ensaio FRAP, expressos em mmol de Fe^{2+} por 100 g de mirtilo, para as várias amostras estudadas encontram-se na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Valores do ensaio FRAP nas diferentes amostras

Amostras	Valores de FRAP
	(mmol Fe^{2+} /100 g de mirtilo)
Patriot	1,620 ^a \pm 0,042
Bluecrop	1,287 ^b \pm 0,012
Duke	1,719 ^c \pm 0,046
Earlyblue	1,277 ^b \pm 0,040
O’Neal	1,167 ^d \pm 0,022

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$)

Os valores de FRAP obtidos para as variedades analisadas são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$), com exceção das variedades Bluecrop e Earlyblue que são significativamente semelhantes. Em relação à variedade Earlyblue foi possível observar que o valor de FRAP encontrado foi aproximadamente o dobro do valor encontrado para a mesma variedade quando cultivada no estado brasileiro do Rio Grande do Sul (0,699 mmol Fe^{2+} /100 g) (Rodrigues *et al.*, 2011). Esta diferença pode refletir as diferenças de clima, solo e técnica de cultivo verificadas entre a zona de Sever do Vouga e o estado do Rio Grande do Sul.

Os valores obtidos variaram entre 1,167 mmol Fe^{2+} /100 g de mirtilo para a variedade O’Neal e 1,719 mmol Fe^{2+} /100 g de mirtilo para a variedade Duke. Assim, nas variedades em estudo, o maior valor de FRAP foi encontrado na variedade Duke, que foi aquela que apresentou maior valor em compostos fenólicos, e o menor na variedade O’Neal, que foi a que apresentou menor teor em fenóis. Esta tendência está de acordo com os resultados publicados por outros autores, que reportam que os valores de poder redutor vão aumentando com concentrações crescentes de compostos fenólicos nos extratos de mirtilo (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2010).

Analisando a literatura verifica-se a existência de uma grande amplitude nos valores de FRAP reportados, variando estes entre os 0,699 e o 2,64 mmol Fe^{2+} /100 g (Koca e Karadeniz, 2009;

Giovaneli e Buratti, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011) para diversas variedades de mirtilos cultivados, apresentando os mirtilos selvagens valores substancialmente mais elevados (entre 3,4 e 5,7) (Giovaneli e Buratti, 2009; Koca e Karadeniz, 2009). Assim, os valores de FRAP encontrados para as variedades de mirtilos em estudo encontram-se dentro da gama de valores obtida por outros autores para os mirtilos cultivados.

4.4.1.2. Determinação da atividade de redução do Cu(II) a Cu(I) pelo ensaio CUPRAC

A tabela 4.5 mostra os resultados obtidos na determinação da redução do Cu^{2+} pelo ensaio de CUPRAC, expressos em mmol equivalentes de ácido ascórbico por 100 g de mirtilo.

Tabela 4.5 – Valores do ensaio CUPRAC nas diferentes amostras

Amostras	Valores de CUPRAC (mmol eq. de ácido ascórbico/ 100g de mirtilo)
Patriot	1,082 ^a ± 0,029
Bluecrop	1,094 ^a ± 0,015
Duke	1,384 ^b ± 0,021
Earlyblue	1,110 ^a ± 0,033
O'Neal	1,114 ^a ± 0,014

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

A observação dos resultados obtidos permite concluir que os valores das diferentes variedades são significativamente semelhantes de acordo com o teste t ($p < 0,05$) à exceção da variedade Duke que apresenta um valor significativamente diferente. O valor do CUPRAC para a maioria das variedades analisadas é de aproximadamente 1,1 mmol eq. de ácido ascórbico/ 100 g de mirtilo e para a variedade Duke é de 1,384 mmol eq. de ácido ascórbico/100 g de mirtilo. Não foi possível encontrar qualquer estudo que reportasse valores de CUPRAC (utilizando o ácido ascórbico como padrão) relativamente a amostras de mirtilo, de forma a serem comparados com os obtidos neste ensaio.

Analisando de forma conjunta os valores obtidos, para as diferentes variedades de mirtilo em estudo, nos ensaios FRAP e CUPRAC é possível verificar que é a variedade Duke a que apresenta os valores mais elevados em ambos os ensaios.

4.4.2. Determinação da capacidade de quelação de ferro

A capacidade de quelação do ferro pode ser encarada como um mecanismo de atividade antioxidante (Geckil *et al.*, 2005), uma vez que, nas reações de Fenton, os iões Fe^{2+} podem gerar espécies reativas de oxigénio ao reagirem com o peróxido de hidrogénio ou com hidroperóxidos lipídicos.

Pela análise dos ensaios dos vários extratos de mirtilo não foi possível detetar nenhuma quelação do Fe(II) , uma vez que não se verificou inibição da formação dos complexos entre o Fe(II) e a ferrozina em nenhuma das amostras testadas até uma concentração de 50 mg/mL. Este resultado indica que os compostos fenólicos presentes nos extratos de mirtilos, ou não têm capacidade de quelar o Fe(II) ou têm uma afinidade para com este ião inferior à da ferrozina.

Conforme a estrutura dos compostos fenólicos, estes apresentam maior ou menor afinidade química para com os catiões dos metais de transição, tendo, assim, capacidade para os complexar, tornando-os indisponíveis para participar nas reações de Fenton. Esta característica dos polifenóis faz com que extratos preparados a partir de alimentos com elevada concentração destes compostos possam, igualmente, apresentar capacidade de quelação de iões metálicos. Com efeito, extratos de plantas aromáticas (Dorman *et al.*, 2003 e 2004), de própolis (Geckil *et al.*, 2005) ou de bagas de zimbro (Micelli *et al.*, 2009) têm mostrado capacidade de quelação de Fe(II) . No entanto esta mesma característica de quelação de metais, pode, igualmente, acarretar um lado menos positivo quando contribui para a redução da absorção digestiva de diversos elementos minerais essenciais (Ferguson, 2001).

4.4.3. Determinação da atividade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio

A avaliação da capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigénio foi realizada recorrendo a ensaios que detestam a capacidade das amostras para efetuar o sequestro de três importantes espécies reativas de oxigénio: o peróxido de hidrogénio, o radical anião superóxido e o radical peróxido (ensaio ORAC). O facto de todas estas espécies reativas de oxigénio se poderem formar *in vivo* confere, a todos estes ensaios, importante relevância fisiológica.

4.4.3.1. Determinação da capacidade de sequestro do peróxido de hidrogénio por medição da absorção no UV

A tabela 4.6 mostra os resultados obtidos na avaliação da capacidade que as diferentes variedades de mirtilo apresentaram para sequestrar o peróxido de hidrogénio.

Tabela 4.6 – Percentagem de sequestro do H₂O₂ nas diferentes variedades de mirtilo

Amostras	Valores da percentagem de sequestro de H ₂ O ₂ (% de sequestro do H ₂ O ₂)
Patriot	18,1 ^{a,b} ± 1,0
Bluecrop	19,3 ^{b,c} ± 1,0
Duke	17,7 ^a ± 0,5
Earlyblue	19,5 ^c ± 0,8
O’Neal	22,4 ^d ± 0,8

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

As percentagens de sequestro variam entre 17,7%, para a variedade Duke, e 22,4%, para a O’Neal. Assim, os valores obtidos neste ensaio mostram que a variedade O’Neal é a que apresenta a maior percentagem de sequestro do peróxido de hidrogénio com 22,4%, valor que é significativamente diferente das outras variedades, de acordo com o teste t (p<0,05).

4.4.3.2. Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano

A tabela 4.7 mostra os valores das percentagens de sequestro do radical anião superóxido nas diferentes variedades de mirtilo em estudo.

Tabela 4.7 – Valores de inibição do superóxido obtidos nas diferentes variedades de mirtilo.

Amostras	% sequestro do anião superóxido
Patriot	93,3 ^a ± 1,9
Bluecrop	93,8 ^a ± 1,1
Duke	93,9 ^a ± 2,4
Earlyblue	93,6 ^a ± 0,0
O’Neal	93,6 ^a ± 0,0

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

Os valores das percentagens de inibição são muito próximos, variando entre 92,99% e 93,88% de inibição. Não se verificaram, nas condições experimentais utilizadas, diferenças significativas entre essas percentagens diferenças significativas de acordo com o teste t ($p < 0,05$), entre nenhuma das amostras, sendo as percentagens de sequestro do radical anião superóxido muito elevadas. Este fato pode ter-se devido à utilização de uma quantidade de amostra demasiado elevada para permitir detetar diferenças entre as amostras.

4.4.3.3. Determinação da atividade antioxidante através da análise da capacidade de resgate do radical peroxilo pelo ensaio ORAC

A tabela 4.8 mostra os valores obtidos na atividade antioxidante por sequestro do radical peroxilo, expressa em μmol de equivalente de trolox por g de mirtilo, nas diferentes variedades estudadas. Os valores obtidos mostram que todas as amostras apresentaram capacidade de inibir a oxidação da fluoresceína induzida pelo radical peroxilo, ou seja, em todas as amostras existem compostos capazes de doar um átomo de hidrogénio ao radical promovendo a sua desativação.

Tabela 4.8 - Valores obtidos nas diferentes variedades de mirtilo no ensaio ORAC.

Amostras	ORAC
	($\mu\text{mol eq trolox/g de mirtilo}$)
Patriot	$13,51^{a,b} \pm 0,87$
Bluecrop	$12,74^b \pm 0,30$
Duke	$15,51^a \pm 0,17$
Earlyblue	$14,52^a \pm 0,78$
O'Neal	$12,81^{a,b} \pm 1,16$

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

Os valores de ORAC obtidos variaram entre os $12,74 \mu\text{mol eq trolox/g}$ de mirtilo, para a variedade Bluecrop, e $15,51 \mu\text{mol eq trolox/g}$ de mirtilo para a variedade Duke. De um modo geral os valores de ORAC obtidos aproximaram-se bastante dos valores reportados por Ehlenfeldt e Prior (2001) para as mesmas variedades de mirtilos cultivadas em Nova Jersey nos Estados Unidos da América. Contudo, esta comparação pode estar afetada de algum erro uma vez que no ensaio realizado por Ehlenfeldt e Prior (2001) o composto fluorescente utilizado foi a R-ficoeritrina enquanto que no presente ensaio foi a fluoresceína. Outros autores, no entanto, reportam valores mais elevados para as

mesmas variedades de mirtilos estudadas, por exemplo, a variedade Duke cultivada na Roménia apresentou um valor de ORAC de 34,85 $\mu\text{mol eq trolox/g}$ de mirtilo (Bunea *et al.*, 2011), e cultivada no estado americano do Oregão apresentou um valor de 32,6 $\mu\text{mol eq trolox/g}$ de mirtilo (Moyer *et al.*, 2002). As diferenças observadas podem dever-se a diferenças de clima, solo ou práticas de cultivo.

4.5. Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do teste de Ames

Nas diferentes variedades de mirtilo, a atividade antimutagénica foi avaliada através da análise da capacidade das amostras para reduzir a mutagenicidade do mutagénico oxidativo tert-butil-hidroperóxido (t-BHP), na estirpe TA100.

A curva de dose-resposta do t-BHP na estirpe TA100 encontra-se na figura 4.1. Com base nesta curva de dose-resposta escolheu-se a dose 1,11 $\mu\text{mol t-BHP/placa}$ para efetuar os ensaios de atividade antimutagénica com os diferentes extratos de mirtilos, uma vez que é uma dose que leva a uma resposta positiva e que ainda se encontra na fase linear da curva de dose-resposta.

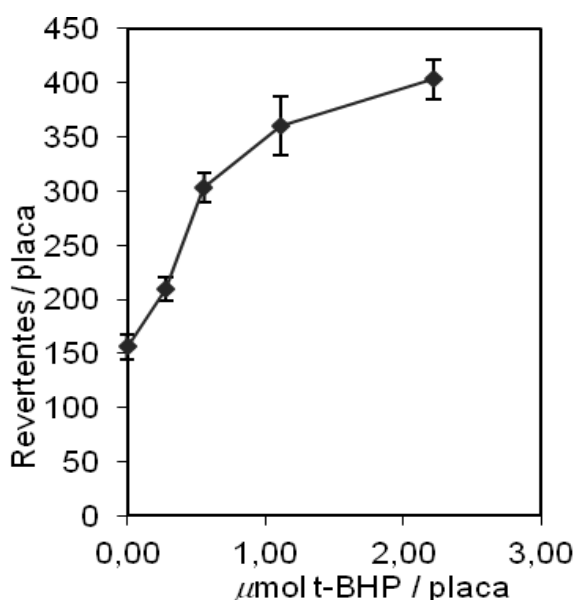


Figura 4.1 – Curva de dose-resposta do t-BHP com a estirpe TA100.

A figura 4.2 apresenta as curvas dose-resposta das diferentes variedades de mirtilo Patriot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O'Neal na presença e na ausência do mutagénico t-BHP, na estirpe TA100. Observando a figura 4.2 (A a E), os extratos das diferentes variedades de mirtilo, quando testadas sem o mutagénico t-BHP (curvas a cinzento), não apresentam mutagenicidade para a estirpe TA100, uma vez que não se verificou uma duplicação do número de revertentes espontâneos em nenhuma das doses ensaiadas. A figura 4.2 permite verificar que todos os extratos das diferentes variedades causaram uma diminuição no número de revertentes induzidos pelo t-BHP e que essa diminuição foi consistente com o aumento da quantidade de amostra (curvas a preto nos gráficos A, B, C, D e E).

Em todas as amostras, o facto do número de revertentes nunca ter descido para valores inferiores aos revertentes espontâneos, em paralelo com o declive pouco acentuado das curvas de atividade antimutagénica e com a existência em algumas das amostras de um patamar no final dessas curvas, prova a ideia de que a diminuição de número de revertentes por placa é resultado da diminuição do número de revertentes induzidos pelo t-BHP, não sendo, por isso, resultado da morte das bactérias devida a fenómenos de toxicidade aguda.

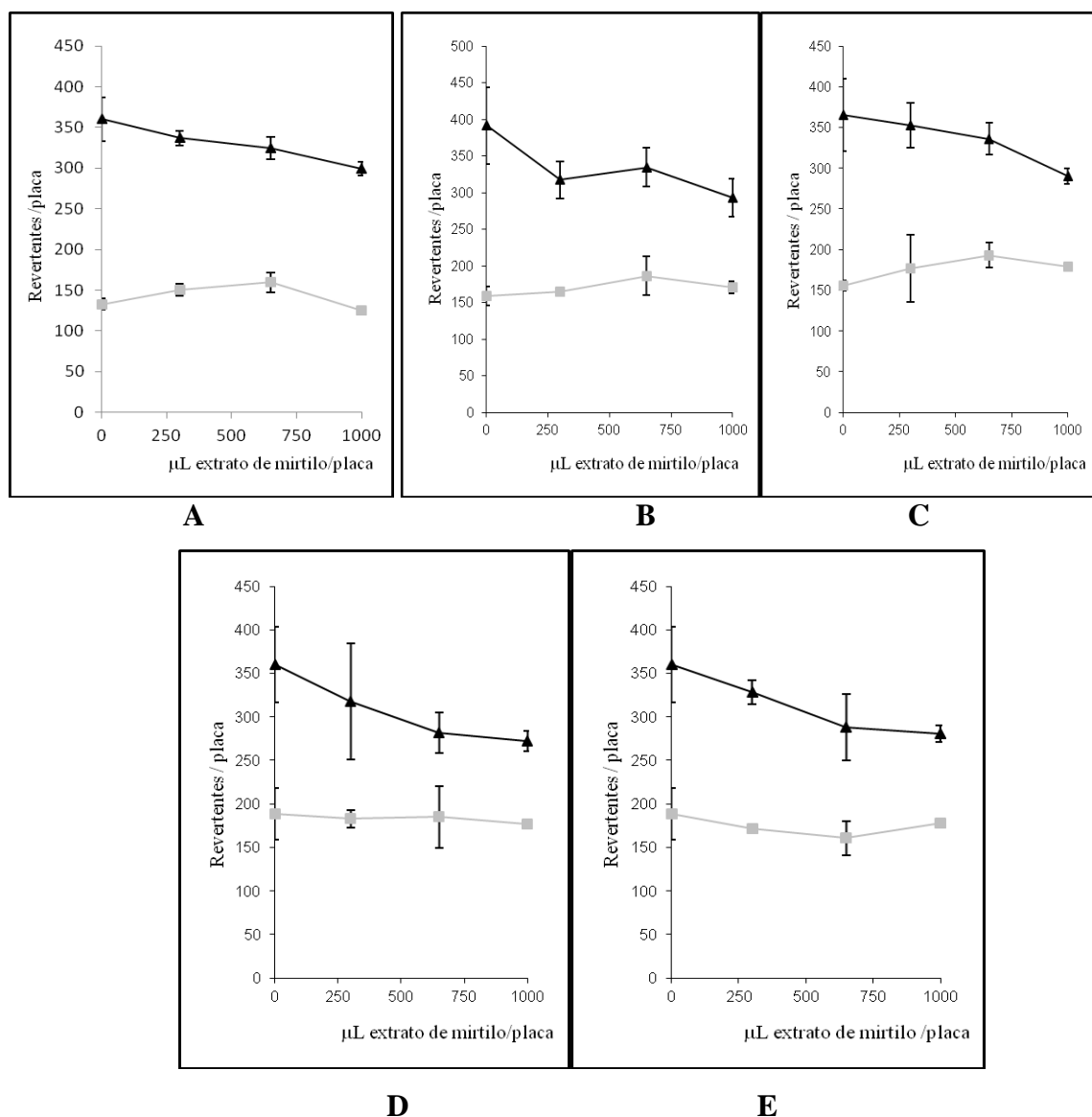
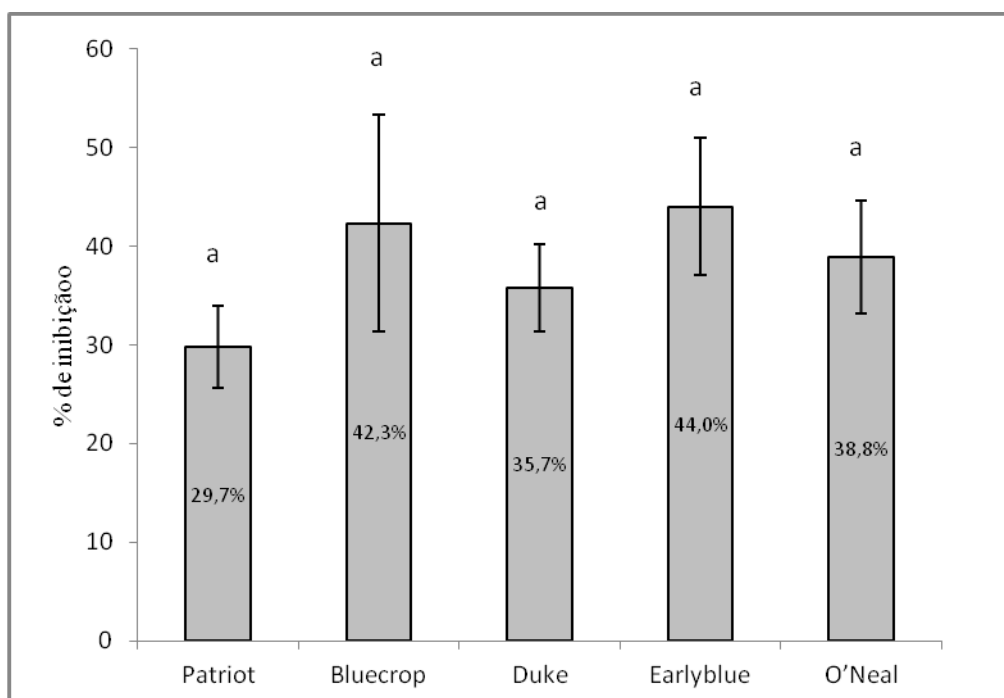


Figura 4.2 - Curvas de dose-resposta dos extratos de mirtilo das diferentes variedades (A) Patriot, (B) Bluecrop, (C) Duke, (D) Earlyblue (E) O'Neal na presença (—▲—) e na ausência (—■—) de t-BHP, na estirpe TA100.

O cálculo da percentagem de máxima de inibição da atividade do mutagénico t-BHP, para as cinco variedades de mirtilo (Figura 4.3) que todas as variedades apresentaram atividade antimutagénica moderada, uma vez que as percentagens de inibição nunca chegaram aos 50%. Não se verificaram diferenças significativas entre as percentagens de inibição obtidas com as diferentes variedades de mirtilo do estudo.



Amostras com letras diferentes significam percentagens de inibição significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0.05$).

Figura 4.3 - Percentagem máxima de inibição da mutagenicidade do t-BHP exercida pelos extratos das variedades de mirtilo Patriot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O'Neal.

4.6. Análise global dos resultados

Com o objetivo de tentar identificar classes de compostos presentes nas variedades de mirtilo que possam ser responsáveis pelas atividades antioxidantes identificadas, bem como de estabelecer relações entre diversos constituintes das amostras, foram efetuadas várias correlações lineares. Assim, foram determinadas as equações das retas que melhor se ajustavam aos vários pontos experimentais obtidos e foi determinado o respetivo coeficiente de correlação linear de Pearson (r). Este coeficiente mede a intensidade da associação linear existente entre as variáveis e pode tomar valores entre -1 e 1 (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 - Classificação da correlação em função do valor do coeficiente de correlação de Pearson (Santos, 2007).

Coeficiente de Pearson (r)	Tipo de correlação
$r = 1$	Perfeitamente positiva
$0,8 \leq r < 1$	Fortemente positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderadamente positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fracamente positiva
$0 < r < 0,1$	Infimamente positiva
$r = 0$	Nula
$-0,1 < r < 0$	Infimamente negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fracamente negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderadamente negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Fortemente negativa
$r = -1$	Perfeitamente negativa

Na tabela 4.10 apresentam-se os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis totais, o teor em antocianinas monoméricas totais e grau Brix para as cinco variedades de mirtilos analisadas (Patriot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O'Neal).

Tabela 4.10 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e antocianinas monoméricas das cinco amostras estudadas.

	Fenóis^a	Antocianinas monoméricas^b	Brix^c
Fenóis^a	1		
Antocianinas monoméricas^b	0,5285	1	
Brix^c	0,0224	-0,2857	1

a) mg eq ác.gálico/100 g de mirtilo; b) mg eq. cianidina /100g de mirtilo; c) %.

Analisando os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis totais, o teor em antocianinas monoméricas e grau Brix para as cinco variedades de mirtilos estudadas (Patriot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O'Neal) (Tabela 4.10), verifica-se a existência de uma correlação moderadamente positiva ($r = 0,5285$) entre o teor em fenóis totais e o teor de antocianinas monoméricas, enquanto que o grau Brix parece variar de uma forma independente, uma vez que não se verifica a existência de associações significativas entre estes dois parâmetros e o valor do grau Brix. Analisando os resultados individualmente verificou-se que uma das variedades, a variedade Patriot,

apresentava um comportamento diferente das restantes uma vez que apesar de ter sido uma das variedades com menor teor em fenóis totais apresentou um teor em antocianinas monoméricas mais elevado. Assim, efetuou-se igualmente a análise de correlação excluindo esta variedade (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e antocianinas monoméricas nas amostras das variedades Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal.

	Fenóis^a	Antocianinas monoméricas^b	Brix^c
Fenóis^a	1		
Antocianinas monoméricas^b	0,9912	1	
Brix^c	-0,1292	-0,0710	1

a) mg eq ác.gálico/100 g de mirtilo; b) mg eq. cianidina /100g de mirtilo; c) %.

Quando se exclui a variedade Patriot, verifica-se que a correlação entre o teor em fenóis totais e antocianinas monoméricas totais altera-se para fortemente positiva, continuando, no entanto, a não se verificar nenhuma associação entre estes dois parâmetros e o valor do grau Brix (Tabela 4.11). Desta forma, os resultados sugerem que, com exceção da variedade Patriot, quanto maior o teor em fenóis das amostras maior o seu teor em antocianinas monoméricas. A variedade Patroit contraria esta correlação, uma vez que foi a que apresentou o teor mais elevado em antocianinas monoméricas (Tabela 4.2), ao mesmo tempo que foi uma das que apresentou um menor teor em fenóis totais (Tabela 4.1). Desta forma, as antocianinas monoméricas parecem ter um maior peso nos fenóis totais na variedade Patriot do que nas restantes variedades.

Na tabela 4.12 e 4.13 apresentam-se os valores de coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis, antocianinas e grau Brix e a atividade antioxidante para as cinco variedades de mirtilos estudadas (Tabela 4.12) e apenas para as variedades Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal (Tabela 4.13).

Tabela 4.12 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante das cinco variedades em estudo.

	Fenóis ^a	Antocianinas monoméricas ^b	Brix ^c	FRAP ^d	CUPRAC ^e	Sequestro do H ₂ O ₂ ^f	Sequestro do superóxido ^f	ORAC ^g
Fenóis^a	1							
Antocianinas monoméricas^b	0,5285	1						
Brix^c	-0,0224	-0,2857	1					
FRAP^d	0,7131	0,9644	-0,3447	1				
CUPRAC^e	0,9660	0,4741	0,1142	0,6420	1			
Sequestro do H₂O₂^f	-0,6254	-0,7750	0,5943	-0,8616	-0,4416	1		
Sequestro do superóxido^f	0,6423	-0,2335	-0,0625	0,0194	0,6639	-0,0824	1	
ORAC^g	0,8805	0,5259	0,2242	0,6505	0,8015	-0,6083	0,3519	1

a) mg eq. ác.gálico/100 g de mirtilo; b) mg eq. cianidina /100 g mirtilo; c) %; d) mmol Fe²⁺/100 g de mirtilo; e) mmol eq. de ácido ascórbico/ 100g de mirtilo; f) %de inibição; g) µmol eq. Trolox/g.

Tabela 4.13 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante das variedades Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal.

	Fenóis ^a	Antocianinas monoméricas ^b	Brix ^c	FRAP ^d	CUPRAC ^e	Sequestro do H ₂ O ₂ ^f	Sequestro do superóxido ^f	ORAC ^g
Fenóis^a	1							
Antocianinas monoméricas^b	0,9912	1						
Brix^c	-0,1292	-0,0710	1					
FRAP^d	0,9942	0,9881	-0,2143	1				
CUPRAC^e	0,9648	0,9911	-0,0014	0,9631	1			
Sequestro do H₂O₂^f	-0,8252	-0,7493	0,5295	-0,8339	-0,6573	1		
Sequestro do superóxido^f	0,7753	0,7670	-0,6689	0,8372	0,7380	-0,7864	1	
ORAC^g	0,8829	0,8500	0,1869	0,8289	0,8065	-0,7318	0,4157	1

a)mg eq. ác.gálico/100 g de mirtilo; b) mg eq. cianidina /100 g mirtilo; c) %; d) mmol Fe²⁺/100 g de mirtilo; e) mmol eq. de ácido ascórbico/ 100g de mirtilo; f) %de inibição; g) µmol eq. Trolox/g.

A análise das Tabelas 4.12 e 4.13 mostra a inexistência de associações significativas entre o grau Brix e os ensaio FRAP e CUPRAC e a existência de correlações fortemente positivas entre o teor em fenóis totais e a atividade antioxidante determinada no ensaio CUPRAC e entre o teor em antocianinas e a atividade antioxidante determinada pelo ensaio FRAP, verificando-se a existência de correlações moderadamente positivas entre o teor em fenóis totais e o ensaio FRAP e fracamente positivas entre o teor em antocianinas e o ensaio CUPRAC. Contudo, quando se elimina a amostra Patriot, que, conforme anteriormente referido, parece ser diferente de todas as restantes amostras, as

correlações entre fenóis, antocianinas e estes dois ensaios de atividade antioxidante passam a ser todas fortemente positivas.

Assim, estes resultados indicam que as variedades com maior teor de fenóis totais, e, em particular, em antocianinas, foram as que apresentaram maiores valores de FRAP e de CUPRAC, indicando que os polifenóis contribuem significativamente para a atividade antioxidante detetada por estes ensaios, ou seja, os resultados obtidos suportam a hipótese dos polifenóis e, em particular, as antocianinas, estarem envolvidos nos mecanismos de atividade antioxidante por transferência eletrônica. No entanto, esta relação entre o teor em antocianinas e o ensaio CUPRAC não se verifica com a variedade Patriot que, apesar de ser das variedades estudadas a que apresentou um teor mais elevado em antocianinas foi a variedades que apresentou o menor valor de CUPRAC.

A existência de uma correlação fortemente positiva entre os ensaios FRAP e CUPRAC ($r = 0,9631$) também aponta no sentido dos compostos responsáveis por estas duas atividades serem, na sua maioria, os mesmos. A existência de correlações fortemente positivas entre o ensaio FRAP e os teores em fenóis e em antocianinas foi igualmente verificada por outros autores (Giovaneli e Buratti, 2009; Koca e Karadeniz, 2009; Bunea *et al.*, 2011). No estudo de Bunea e colaboradores (2011) esta correlação foi encontrada em várias variedades de mirtilo cultivados e selvagens da Roménia, entre as quais se encontravam as variedades Duke e Bluecrop igualmente estudadas no presente trabalho.

Em relação aos ensaios de sequestro das espécies reativas de oxigénio (peróxido de hidrogénio, radical anião superóxido e radical peroxilo) o que melhor se correlacionou com o teor em fenóis totais foi o sequestro do radical peroxilo, que apresentou uma correlação fortemente positiva, seguido do radical anião superóxido, que apresentou uma correlação moderadamente positiva. Entre o teor de antocianinas monoméricas e os valores de ORAC verificou-se uma correlação moderadamente positiva, contudo esta correlação passa a fortemente positiva quando se elimina a amostra Patriot (Tabela 4.13). Estes resultados sugerem o envolvimento dos compostos fenólicos, e em particular das antocianinas, nestas duas atividades de sequestro. Em relação às associações verificadas entre a composição fenólica das amostras e o sequestro do peróxido de hidrogénio, verificaram-se sempre correlações negativas, sugerindo que os compostos fenólicos em geral, e as antocianinas em particular, não constituam o principal grupo de compostos envolvido nesta atividade de sequestro.

Comparando os valores para os diferentes ensaios de atividade antioxidante, obtiveram-se correlações fortemente ou moderadamente positivas entre os ensaios FRAP e CUPRAC e os ensaios de sequestro do radical anião superóxido e ORAC, enquanto que se obtiveram correlações negativas entre os ensaios de atividade redutora e o sequestro de peróxido de hidrogénio. Entre os ensaios de sequestro do radical anião superóxido e ORAC a correlação obtida foi fracamente positivas, sugerindo que possam ser compostos diferentes, particularmente fenóis diferentes, que mais contribuem para as atividades detetadas.

O envolvimento dos fenóis nas atividades de sequestro já tinha sido sugerido por outros autores. Assim, Wang e seus colaboradores (2012) mostraram que a polpa de mirtilo apresenta a existência de uma correlação fortemente positiva entre o teor de fenóis e o sequestro de radical peróxido e uma correlação moderadamente positiva no sequestro do peróxido de hidrogénio e do radical anião superóxido, mas os extratos das amostras da película do mirtilo apresentaram uma correlação fortemente positiva no sequestro do peróxido de hidrogénio, do radical anião superóxido e do radical peróxido. Outros estudos (Bunea *et al.*, 2011) mostraram a existência de uma correlação fortemente positiva entre o teor de fenóis totais e os valores de ORAC.

A discrepância que se verifica entre os resultados publicados por outros autores e os resultados obtidos com as amostras em estudo, em relação ao envolvimento dos fenóis na atividade de sequestro do peróxido de hidrogénio, pode resultar do pequeno número de amostras estudadas ou do fato de, em muitos casos, as diferenças obtidas não terem sido sequer significativas. Além disso, esta análise baseada unicamente em ferramentas estatísticas apresenta diversas limitações. A análise de correlações que se efetuou pretende apenas sugerir possíveis associações entre as classes de compostos presentes nas amostras de mirtilo e as atividades antioxidantes detetadas. Assim, as propriedades antioxidantes dos compostos isolados dentro de um grupo podem variar consideravelmente de modo que os mesmos níveis de compostos fenólicos não correspondam necessariamente às mesmas respostas antioxidantes. O fato das amostras de mirtilo serem misturas complexas, com múltiplos compostos diferentes, faz com que possam coexistir compostos com atividades opostas, por exemplo, compostos com atividade antioxidante juntamente com compostos com atividade pró-oxidante, ou ainda que possam ocorrer fenómenos de sinergia e/ou potenciação entre os vários compostos, que acabam por, de alguma forma, mascarar os resultados obtidos na análise de correlação.

5. Conclusão

O género *Vaccinium spp.* (*Ericaceae*) compreende cerca de 200 espécies, algumas das quais produzem frutos comestíveis. Nas últimas décadas tem-se verificado um interesse crescente em algumas espécies de *Vaccinium spp.*, devido às propriedades farmacológicas e de promoção da saúde que têm vindo a ser associadas a estes frutos. Estas propriedades incluem atividade antioxidante (Wang *et al.*, 1997; Mazza *et al.*, 2002; Lohachoompol *et al.*, 2004), anti-inflamatória (Youdim *et al.*, 2002), de proteção cardiovascular, antidiabéticas e de melhoria da visão (Katsube *et al.*, 2003).

Muitas destas propriedades são atribuídas ao elevado teor em polifenóis dos mirtilos. O teor das bagas nestes compostos, bem como o perfil exato em que estes aparecem, varia em função de fatores intrínsecos (variedade, estágio de maturação, etc.) e extrínsecos (condições de clima, solo e práticas de cultura), assim as frutas apresentam, em termos quantitativos e qualitativos, composição variada desses compostos. Por sua vez, a eficácia da ação antioxidante depende da estrutura química e da concentração destes fitoquímicos nos alimentos (Melo *et al.*, 2008).

Assim, este trabalho teve por objetivo fazer um estudo comparativo do teor de fenóis totais, antocianinas e da atividade antioxidante e antimutagénica em cinco variedades de mirtilo produzidas em Portugal (Partiot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O'Neal) mais concretamente na Sub-região do Baixo-Vouga. O fato de todas as plantas terem estado sujeitas aos mesmos fatores de cultivo (mesma localização e ano de produção) elimina os efeitos de diferenças climatéricas, níveis de radiação UV, temperatura ambiente, *stress* hídrico, composição do solo e disponibilidade de fatores nutricionais. Todas as amostras foram, igualmente, colhidas com o grau de maturação adequado à sua comercialização, transportadas para o laboratório e analisadas em iguais condições. Assim, as diferenças observadas devem-se principalmente a diferenças genéticas entre as diferentes cultivares.

A capacidade para inibir o efeito do mutagénico oxidativo do *tert*-butil-hidroperóxido foi utilizada para avaliar a atividade antimutagénica, tendo a atividade antioxidante sido avaliada com recurso a diferentes tipos de ensaios com o objetivo cobrir os vários dos mecanismos pelos quais esta atividade pode ser exercida. Assim, foram então realizados ensaios de avaliação da atividade redutora (FRAP e CUPRAC), da capacidade de sequestro de três espécies reativas de oxigénio passíveis de se formarem *in vivo*, nomeadamente, do peróxido de hidrogénio e dos radicais anião superóxido e peróxido, e ainda a capacidade de quelação de Fe (II).

Os resultados mostram que todas as variedades de mirtilo estudadas apresentaram atividade antioxidante e atividade antimutagénica. A variedade Duke foi a que apresentou o teor mais elevado em compostos fenólicos totais e a que mais se distinguiu na atividade redutora, apresentando os valores de FRAP e CUPRAC mais elevados. Esta variedade também mostrou maior capacidade de

desativação do radical peróxido, detetada pelo ensaio ORAC. Por outro lado, a variedade O'Neal, foi a que apresentou uma maior capacidade de sequestro do peróxido de hidrogénio. Com exceção da atividade de sequestro do peróxido de hidrogénio, todas as outras atividades antioxidantes parecem relacionar-se com o teor em compostos fenólicos e, em particular, em antocianinas.

Concluindo, neste trabalho foi possível detetar *in vitro* a existência de atividade antioxidante e de atividade antimutagénica nas cinco variedades de mirtilos estudadas. No entanto, a extrapolação dos resultados obtidos em ensaio *in vitro* para a situação *in vivo*, tem que ser cuidadosamente ponderada, uma vez que a manutenção das propriedades verificadas *in vitro* depende de vários fatores, como, por exemplo, do fato dos compostos por elas responsáveis resistirem ao processo de digestão gastrointestinal, serem absorvidos pelas células do intestino e não serem rapidamente inativados nem pelas bactérias da flora intestinal, nem pelas enzimas de biotransformação humanas. Para se poder ponderar a extrapolação dos resultados seriam necessários estudos mais aprofundados sobre a biodisponibilidade dos compostos bioativos dos mirtilos estudados.

A absorção digestiva dos polifenóis parece variar dependendo da sua estrutura, o que faz com que nem sempre sejam os polifenóis mais abundantes nos alimentos aqueles que podem atingir maiores concentrações no interior das células humanas. Estudos relatam que as proantocianidinas são pouco absorvidas e a sua ação é limitada ao intestino, já a ingestão de flavonoides monoméricos, flavonas e flavonoides são relativamente baixos e as concentrações plasmáticas raramente excedem 1 µmol/L por causa da absorção limitada e eliminação rápida. As flavanonas e isoflavonas são os flavonoides com os perfis de melhor biodisponibilidade e as concentrações plasmáticas podem chegar a 5 µmol/L (Manach *et al.*, 2004). Apesar da absorção dos fenóis poder ser limitada, alguns estudos, efetuados em voluntários humanos saudáveis, mostram que após a ingestão de mirtilos a capacidade antioxidante do plasma aumenta (Serafini *et al.*, 2009).

Um importante contributo para possibilitar a extrapolação dos resultados obtidos para a situação real *in vivo* seria a realização de ensaios sobre a resistência ao processo de digestão, a possibilidade de absorção e sobre a biotransformação dos compostos bioativos presentes nestes mirtilos. Seria igualmente interessante o estudo da atividade antimutagénica utilizando diferentes mutagénicos alimentares, por exemplo, a aflatoxina B₁, o benzo(a)pireno ou aminas aromáticas heterocíclicas. Todos estes compostos são mutagénicos indiretos, ou seja requerem ativação metabólica para exercerem os efeitos lesivos sobre o DNA. Por outro lado, para melhor poder compreender as diferenças encontradas entre as diversas cultivares em estudo seria importante a identificação e caracterização dos compostos fenólicos presentes nas várias cultivares de modo a tentar estabelecer correlações entre as atividades biológicas e a presença ou ausência de compostos específicos. Este tipo de análise permitiria identificar os principais compostos bioativos presentes nas diferentes cultivares de mirtilo.

Uma vez que existem espécies silvestres do género *Vaccinium* em Portugal na Serra do Gerês, na Ilha da Madeira e no arquipélago dos Açores, seria interessante quantificar e caraterizar o perfil dos polifenóis presentes nestas variedades assim como as suas capacidades antioxidantes e antimutagénicas e compará-las com as variedades de mirtilo cultivadas e comercializadas.

6. Referências Bibliográficas

- Ahn J.H., Kim Y.P., Seo E.M., Choi Y.K. e Kim H.S., (2008). Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sun ower oil. *Journal of Food Engineering*, **84(2)**, 327-34.
- AICR-WCRF American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, (2007). Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington, DC.
- Alderton W.K., Cooper C.E. e Knowles R.G., (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Journal Biochemistry*, **1(357)**, 593-615.
- Al-Gubory K.H., Fowler P.A. e Garrel C., (2010). The roles of cellular reative oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42(10)**, 1634–1650.
- Alves R.E., Brito E.A., Rufino M.S. M. e Sampaio C. G., (2008). Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study acerola. *Act Horticulturae*, **773**, 299-305.
- Anjo D.L.C., (2004). Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, **3**, 145-154.
- Antunes L.M.G. e Araújo M.C.P., (2000). Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. *Revista Nutrição*, **13 (2)**, 81-88.
- Apak R., Güglü K., Özyürek M. e Karademir S.E., (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7970–7981.
- Araújo P.W.B., Júnior L.J.Q., Vasconcelos H.D. e Almeida J.R.G.S., (2005). Flavonóides e Hipertensão. *Revista Brasileira de Hipertensão*, **12(3)**, 188-189.
- Bastos D. H. M., Rogero M. M. e Arêas J. A. G., (2009). Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, **53**, 646.
- Beattie J., Crozier, A. e Duthie, G. G., (2005). Potencial Haelth Benefits of Berries. *Current Nutrition e Food Science*, **1**, 71-86.
- Beckman K.B. e Ames B. N., (1997). Oxidative decay of DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, **272 (32)**, 19633-19636.
- Behling E.B., Sendão M.C., Francescato H.D.C., Antunes L.M.G. e Bianchi M.L.P., (2004). Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição*, **15(3)**, 285-292.
- Benzie I.F.F. e Strain J.J., (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70–76.
- Bernal J., Mendiola J.A., Ibáñez E. e Cifuentes A., (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55(4)**, 758-774.

- Bishop J.M., (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-248.
- Blumenthal M., Goldberg A. e Brinckmann J., (2000). Herbal Medicine: expanded commission and monographs. Newton (USA): *American Botanical Council*, **519**.
- Bunea A., Rugina D. O., Pinteá A.M., Sconta Z., Bunea C.I. e Socáciu C., (2011). Comparative Polyphenolic Content and Antioxidant Activities of Some Wild and Cultivated Blueberries from Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, **39(2)**, 70-76.
- Burdulis D., Ivanauskas L., Diršė V., Kazlauskas S. e Ražukas A., (2007). Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Medicina (Kaunas)*; **43(12)**, 971–977.
- Busby W.F.J. e Wogan G.N., (1984). Aflatoxins. *Chemical Carcinogens*, ed. C Searle, 945–1136.
- Candido L.M.B. e Campos A. M., (2005). Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCRA*, **29**, 193-203.
- Carlsen H., Myhrstad M.C.W., Thoresen M., Moskaug J.Ø. e Blomhoff R., (2003). Berry intake increases the activity of the glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *The Journal of Nutrition*, **133**, 2137–2140.
- Chitarra M.I.F. e Chitarra A.B., (2005). Pós-colheita de futas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2º ed. Lavras: UFLA, 783.
- Chung, F.-L., Chen, H.-J. C., e Nath, R. G., (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, **17(10)**, 2105-2111.
- Connor A.M., Luby J.J., Tong C.B.S., Finn C.E. e Hancock J.F., (2002). Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among Blueberry Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127(1)**, 89–97.
- Costa J. P., (2010). Jornal de Notícias – “Capital do mirtilo” pretende quadruplicar produção até 2014 - Rentabilidade e garantia de escoamento fez disparar o número de produtores -2010-06-25 consultado em 7 de julho 2011.
- Courtemanche C., Huang A.C., Elson-Schwab I., Kerry N., Ng B.Y. e Ames B.N., (2004). Folate deficiency and ionizing radiation cause DNA breaks in primary human lymphocytes: a comparison. *FASEB Journal*, **18**, 209–11.
- Covarrubias L., Hernández-García D., Schnabel D., Salas-Vidal E. e Castro-Obregón S., (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, **320**, 1-11.
- Crozier A., Jaganath I. B. e Clifford M. N., (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, **26**, 1001.
- D’Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. e Masella, R., (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, **43**, 348.
- Dall-Done R., Giustarini D., Milzani A. e Colombo R., (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, **329**, 23-38.

- Delfino R.J., Sinha R., Smith C., West J., White E. e Lin H.J., (2000). Breast cancer, heterocyclic aromatic amines from meat and N-acetyltransferase 2 genotype. *Carcinogenesis*, **21(4)**, 607-15.
- Dorman H.J.D., Bachmayer O., Koşar M. e Hiltunen R., (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**, 762–770.
- Dorman H.J.D., Koşar M., Kahlos K., Holm Y. e Hiltunen R., (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 4563–4569
- Dragovic-Uzelac D., Savic Z., Brala A., Levaj B., Bursac D., Kovacevic B. D. e Bisko A., (2010). Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Blueberry Cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) Grown in the Northwest Croatia. *Food Technology and Biotechnology*, **48 (2)**, 214–221.
- Dunlap W., Llewellyn L., Doyle J. e Yamamoto Y., (2003). A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. *Marine Biotechnology*, **5(3)**, 294–301.
- Eck P., (1988). *Blueberry Science*. Rutgers University Press, New Brunswick and London.
- Ehlenfeldt M.K. e Prior R.L., (2001). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2222–2227.
- Esmaili M.A. e Sonboli A., (2010). Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 846–853
- Exon J.H., (2006). A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, **9**, 397–412.
- Fachinello J.C., (2008). Mirtilo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **30(2)**.
- Falahatpisheh M.H., Kerzee J.K., Metz R.P., Donnelly K.C. e Ramos K.S., (2004). Inducible cytochrome P450 activities in renal glomerular mesangial cells: biochemical basis for antagonistic interactions among nephrocarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal Carcinogenesis*, **3(1)**, 12.
- FAO, (2010). Production Crops. Disponível em <http://faostat.fao.org>. Acesso em mar.2010.
- Faria A., Oliveira J., Neves P., Gameiro P., Santos-Buelga C., Freitas V. e Mateus N., (2005). Antioxidant properties of prepared Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53(17)**, 6896-6902.
- Felton J.S., Knize M.G., Wu R.W., Colvin M.E., Hatch F.T. e Malfatti M.A., (2007). Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. *Mutation Research*, **616(1-2)**, 90-4.
- Fenech M. e Ferguson L.R., (2001). Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutation Research*, **475**, 1–6.
- Ferguson L. R. e Philpott M., (2008). Nutrition and Mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr.*, **28**, 313-32.

- Ferguson L.R., (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, 89-111.
- Ferguson L.R., Gregory T.J., Pearson A.E., Hay J.E. e Lewis G.D., (1996). Mutagenicity tests as a monitoring tool for potential mutagens and carcinogens in shellfish gathering areas of New Zealand. *Marine and Freshwater Research*, **30**, 413-21.
- Ferrari R., Ceconi C., Curello S., Guarnieri C., Caldarera M., Albertini A. e Visioli O., (1985). Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **17**, 937-45.
- Fridovich I., (1998). Oxygen toxicity: radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, **201**, 1203-1209.
- Fu P.P., Xia Q., Lin G. e Chou M.W., (2004). Pyrrolizidine alkaloids—genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*, **36**, 1-55.
- Galletta G.J. e Ballington J.R., (1996). Blueberry, cranberries, and lingonberries *In*: Janick J.e Moore J.N., (1995). Fruit breeding: vine and small fruits. New York: Willey & Sons, 1-108.
- Galloway T. e Handy R., (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, **12**, 345-363.
- García-Closas R., García-Closas M., Kogevinas M., Malats N., Silverman D., Serra C., (2007). Food, nutrient and heterocyclic amine intake and the risk of bladder cancer. *European Journal of Cancer*, **43(11)**, 1731-40.
- Geckil H., Ates B., Durmaz G., Erdogan S. e Yilmaz I., (2005). Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **1**, 27-31.
- Giovanelli G. e Buratti S., (2009). Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, **112**, 903-908.
- Gross G.A e Grüter A., (1992). Quantitation of mutagenic/ carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. *Journal of Chromatography A*, **592(1-2)**, 271-8.
- Gülçin I., (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, **86(3)**, 345-91.
- Häkkinen S. e Törrönen A.R., (2000). Contento f flavonois and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Recearoh International*, **33**, 517-524.
- Halliwell B., (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*. **73**, 341- 47.
- Halliwell B., (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Journal of Biochemistry*, **401**, 1-11.
- Halliwell B. e Gutteridge J. M. C., (1989). Lipid peroxidation, a radical chain reaction. *In*: Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3 rd ed. Clarendon, Oxford, 900.

- Halliwell B. e Gutteridge J.M.C., (2000). Free Radicals in Biology and Medicine. 3^a ed., Oxford, University Press.
- Hermes-Lima M., (2004). *in* Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Storey K. B. John Wiley and Sons, New Jersey.
- Hickey M.J., Sharkey K.A., Sihota E.G., Reinhardt P.H., Macmicking J.D., Nathan C. e Kubes P., (1997). Inducible Nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia, *Faseb Journal*, **11**, 955-964.
- Holmqvist B.I., Ostholm T., Alm P. e Ekstrom P., (1994). Nitric oxide synthase in the brain of a teleost. *Neurological letters*, **25**, 171(1-2), 205-7.
- Holst B. e Williamson G., (2008). Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *British Journal of Nutrition*, **99**(3), S55–S58.
- Horst M.A. e Lajolo F.M., (2007). Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos *In*: Silvia M.F.C., *Biodisponibilidade de Nutrientes*. 2 ed. São Paulo: Manole, **1**, 697-731.
- Huang D., Ou B. e Prior R.L., (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.
- Hussain S.P., Schwank J., Staib F., Wang X.W. e Harris C.C., (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, **26**, 2166–76.
- Järgestad M. e Skog, K., (2005). Review: genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*, **574**, 156-172.
- Jenkins R.R., (1988). Free radical chemistry relationship to exercise. *Sports Medicine*, **5**, 156-70.
- Joseph J.A., Shukitt-Hale B., Denisova N.A., Bielinski D., Martin A., McEwen J.J. e Bickford P.C., (1999). Reversals of Age-Related Declines in Neuronal Signal Transduction, Cognitive, and Motor Behavioral Deficits with Blueberry, Spinach, or Strawberry Dietary Supplementation. *Journal of Neuroscience*, **19**, 8114-8121.
- Kada T., Morita K. e Inoue T., (1978). Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Research*, Amsterdam, **53**(3), 351-353.
- Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K. e Kobori M., (2003). Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 68-75.
- Kaur C. e Kapoor H. C., (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science e Technology*, **36**, 703-725.
- Kazerouni N., Sinhá R., Hsu C.H., Greenberg A. e Rothman N., (2001). Analysis of 200 food items benzo[a] pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol.*, **39**(5), 423-36.
- Koca I. e Karadeniz B., (2009). Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, **121**, 447–450.

- Kohen R. e Nyska A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, **30(6)**, 620-650.
- Kojda G. e Harrison D.G., (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Research*, **43**, 562-571.
- Kosar M., Fatih G. e Baser K.H.C., (2008). *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2369–2374.
- Kris-Etherton P. M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval, S.M., Binkoski A. E., Hilpert K.F., Griel A.E. e Etherton T.D., (2002). Bioactive Compounds in Food: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine*, **113 (9b)**, 718-883.
- Lavadinho C., Sousa M. B. e Moldão-Martins M., (2001). Influência da data de colheita na qualidade do mirtilo. *Atas do 5º Encontro de Química de Alimentos-Qualidade, Segurança e Inovação, Porto*.
- Lee J., Durst R.W. e Wrolstad R.E., (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *The Journal of AOAC International*, **88**, 269–278.
- Leighton F. e Urquiaga I., (2007). Changes in cardiovascular risk factors associated with wine consumption in intervention studies in humans. *Annals of Epidemiology*, **17(5)**, S32-S36.
- Lin J., Forman M.R., Wang J., Grossman H.B., Chen M., Dinney C.P., Hawk E.T. e Wu X., (2012). Intake of red meat and heterocyclic amines, metabolic pathway genes and bladder cancer risk *International Journal of Cancer*, **131**, 1892–1903.
- Lohachoompol V., Szrednicki G. e Craske J., (2004). The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **5**, 248-252.
- Lopes R. M., Oliveira T.T., De Nagem T.J., Pinto A.S., (2000). Flavonóides. *Bioteχνologia ciência & desenvolvimento*, **17**, 18-22.
- Lui R.H., (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, **134(12)**, 3479S-3485S.
- Lunec J., Holloway K.A., Cook M.S., Faux S., Griffiths H.R. e Evans M.D., (2002). Urinary 8-oxo-2-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radical Biology and Medicine*, **33(7)**, 875-885
- Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S. e Lima J.L.F.C., (2008) Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**, 1–19.
- Maisuthisakul P., Suttajit M. e Pongsawatmanit R., (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, **100**, 1409-1418.
- Makus D.J. e Morris J.R., (1987). Highbush vs. Rabbiteye blueberry: a comparison of fruit quality. *Arkansas Farm Research*, **36(3)**, 5.

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. e Jiménez L., (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*, **79**, 727–47.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A. e Rémésy C., (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**, 230S.
- Maron D.M. e Ames B.N., (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, **113(3-4)**, 173-215.
- Martinez-Valverde I., Periogo M.J. e Ros G., (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Aroquivos Latinoamericanos de Nutrition*, **50 (1)**, 5-18.
- Mazza G., Kay C.D., Cottrell T. e Holub B.J., (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 7731-7737.
- Mccall T.B., Boughton-Smith N.K., Palmer R.M., Whittle B.J. e Moncada S., (1989). Synthesis of Nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Journal Biochemistry*, **261**, 293-296
- Melo E. A., Maciel M.I.S., Lima, V.L.A.G. e Nascimento R.J., (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **44(2)**, 193-201.
- Micelli N., Trovato A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Marino A., Bellinghieri V., La Barbera T.M., Güvenç A. e Taviano M.F., (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 6570–6577.
- Miller E.C. e Miller J.A., (1986). Carcinogens and mutagens that may occur in foods. *Cancer*, **58(8)**, 1795-1803.
- Moon J-K. e Shibamoto T., (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 1655–1666.
- Moraes V. e Locatelli C., (2010). Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. *Evidência*, **10(1-2)**, 57-68.
- Mortelmans K. e Zeiger E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay.
- Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B. e Wrolstad R.E., (2002). Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50 (3)**, 519–525
- *Mutation Research*, **455**, 29–60.
- Naczki M. e Shahidi F., (2004). Extraction and analysis of phenolics in food – Review, *Journal of Chromatography A*, **1054(1-2)**, 95-111
- Nakamura S, Kato A. e Kobayashi K., (1992) Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 2033–2037.
- Neto C. (2007) Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, 652–664.

- Oliveira D.M. e Bastos D. H. M., (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos *Química Nova*, **34(6)**, 1051-1056.
- Olken N.M., Osawa, Y. e Marletta, M.A., (1994). Characterization of the inactivation of Nitric oxide synthase by NG-methyl-L-arginine: evidence for heme loss. *Biochemistry*, **33**, 14784-14791.
- Ou B., Hampsch-Woodill M. e Prior R.L., (2001). Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4619-4626.
- Passamonti A. S., Vrhovsek U., Vanzo A. e Mattivi F., (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS letters*, **544**, 210-213.
- Peterson J.E. e Dwyer J., (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*. **18**, 1995-2018.
- Pfohl-Leszkowicz A. e Manderville R.A., (2007). Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, **51**, 61-99.
- Phillips D.H., (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research*, **443**, 139-47.
- Prior R.L, Wu X. e Schaich K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4290-4302.
- Prior R.L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J. e O'Brien C., (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46(7)**, 2686-2693.
- Queipo-Ortuño M.I., Boto-Ordóñez M., Murri M., Gomez-Zumaquero J.M., Clemente-Postigo M., Estruch R., Diaz F.C., Andrés-Lacueva C. e Tinahones F., (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *American Journal of Clinical Nutrition*, **95**, 1323-1334.
- Rahman I., Biswas S.K. e Kirkham P.A., (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary Polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, **72**, 1439-1452.
- Ramful D., Bahorun T., Bourdon E., Tarnus E. e Aruoma O.I., (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flaved extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**, 75-87.
- Ramirez M.R., Izquierdi I., Raseira M.D.C.B., Zuanazzi J.A., Barros D. e Henriques A.T., (2005). Effect of lyophilised *vaccium* Berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharmacological Research*, **52**, 457-462.
- Raseira R.J. e Antunes L.E.C., (2004). A cultura do mirtilo (*Vasccinium myrtillus*). *Pelotas: Embrapa Clima Temperado*, **69**.
- Regulski M. e Tully T., (1995). Molecular and biochemical characterization of dNOS: a *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent Nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **26**, 9072-6.
- Ribeiro E.P. e Seravalli E.A.G., (2004). Química de alimentos. São Paulo: Editora Edgard Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia.

- Ribeiro S.M.R., Queiroz J.H., Pelúzo M.C. G., Costa N.M.B., Matta S.L.P. e Queiroz M. E.L.R., (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, **21(3)**, 133-149.
- Rice-Evans C.A. e Miller N.J.E., (1997). Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2**, 152-159.
- Richter C., Park J.W. e Ames B.N., (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National. Academy of Science. USA*, **85**, 6465-6467.
- Riegger M., (2006). Introduction Fruit Crops. Binghamton: Food Products Press, an Imprint of the Haworth Press, Inc., 462.
- Roberfroid M., (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, **34**, 105-10.
- Rodrigues E., Poerner N., Rockenbach I.I., Gonzaga L.V., Mendes C. R. e Fett R., (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Ciências. Tecnologia Alimentares*, Campinas, **31(4)**, 911-917.
- Ross J.A. e Kasum C.M., (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, **22**, 19-34.
- Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M. e Freeman B.A., (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 26066-26075.
- Ryan T.P. e Aust S.D., (1992). The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Critical Reviews in Toxicology*, **22(1)**, 119-141.
- Saftner R., Polashock J., Ehlenfeldt M. e Vinyard B., (2008) Instrumental and sensory quality characteristics of blueberry fruit from twelve cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, **49**, 19-26.
- Santos C., (2007). Estatística Descritiva - Manual de Autoaprendizagem, Edições Sílabo, Lisboa.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. e Jimenez L., (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45(4)**, 287-306.
- Schneider C.D. e Oliveira A.R., (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. Artigo de revisão. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, **10(4)**, 308-313.
- Scholz S. e Williamson G., (2007). Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols *in vivo*. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **77**, 224.
- Sellappan S., Akoh C.C. e Krewer G., (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2432-2438.
- Serafini M., Testa M.F., Villaño D., Pecorari M., Wieren K., Azzini E., Brambilla A. e Maiani G., (2009). Antioxidant activity of blueberry fruit is impaired by association with milk. *Free Radical Biology e Medicine*, **46**, 769-774.

- Serrada F., Pereira M., Fretas S., Martins S. e Dias T., (2008). Mirtilo guia de boas práticas para produção, promoção e comercialização. *ADRMAG*.
- Shahidi, F. e Naczki M., (1995). Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Ed Lancaster: *Technomic Publishing*, 331.
- Shrubsole M.J., Jin F., Dai Q., Shu X., Potter J.D. e Hebert J.R., (2001). Dietary folate intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Research*, **61**(19), 7136-41.
- Sies H., (1993). Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, **215**(2), 213-219. In: Ribeiro S.M.R., Queiroz J.H., Pelúzo M.C.G., Costa N.M.B., Matta S.L.P. e Queiroz M.E.L.R., (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigénio no meio biológico. *Bioscience Journal*, **21**(3), 133-149.
- Singleton V.L., Orthofer R. e Lamuela-Raventos R.M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178.
- Smith M., Marley K.A., Seigler D., Singletary K.W. e Meline B., (2000). Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of food science – Sensory and Nutritive Qualities of Food*, **65**(2), 352-356.
- Soares, S. E., (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, **15**, 71-81.
- Sousa M.B., Curado, T., Vasconcellos F.N. e Trigo M.J., (2007). Mirtilo: qualidade pós-colheita. *Agro divulgação*, **556**(8), disponível em http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/manuais/8_mirtilo_qualidade_pos_colheita.pdf.
- Sousa M.B., Curado T., Lavadinho C. e Moldão-Martins M., (2006). A survey of Quality Factors in Highbush and Rabbiteye Blueberry cultivars in Portugal. *Acta Horticulturae*, **715**, 567-572.
- Spiers J.M., Marshall D.A., Smith B.J. e Braswell J.H., (2004). Method to determine chilling requirement in Blueberries. *Acta Horticulturae*, **715**, 105-110.
- Stadtman E. R. e Levine R.L., (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **25**, 207-218.
- Stahl W e Sies H., (1997). Antioxidant defense: vitamins E, C and carotenoids. *Diabete*, **46**, 14-8.
- Törrönen R.S., Hänninen O., Kaartinen K., Rauma A.-L., Nenonen M., Häkkinen S., Adlercreutz H. e Laakso J., (2000). Antioxidants in vegan diet and rheumatic disorders. *Toxicology*, **155**, 45-53.
- Tricker A. R. e Preussmann R., (1991). Carcinogenic Nnitrosamines in diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. *Mutation Research*, **259**, 277- 289.
- Turkmen I. e Eks A., (2011). Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate (*Punica granatum*) juice. *Food Chemistry*, **12**, 118
- USDA (2011) USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24, <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2266?fg=Fruits+and+Fruit+Juices&man=&lfacet=&format=&count=&max=25&offset=25&sort=&qlookup>, acedido em 14 de abril 2012.

- Valentão P., Fernandes E., Carvalho F., Andrade P.B., Seabra R.M. e Bastos M.L., (2001). Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3476–3479.
- Varlet V., Prost C. e Serot T., (2007). Analytical, nutritional and clinical methods volatile aldehydes in smoked fish: analysis methods, occurrence and mechanisms of formation. *Food Chemistry*, **105**, 1536-56.
- Vatter D.A. e Shetty K., (2005). Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry*, **29**, 234-266.
- Wang H., Cao G. e Prior R.L., (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 304-309.
- Wang L.S. e Stoner G.D., (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, **269**, 281-290.
- Wang S.Y., Camp M.J. e Ehlenfeldt M.K., (2012). Antioxidant capacity and α-glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chemistry* **132**, 1759–1768.
- Wargovich M.J., (1997). Experimental evidence for cancer preventive elements in foods. *Cancer Letters*, **114**(1), 11-17.
- Westwood M.N., (1982). Fruticultura de zonas templadas. Barcelona: Mundi-Prensa, 461.
- WHO, World Health Organization, (2011). 10 facts on the global burden of disease. Cardiovascular diseases are the leading causes of death in the world. Disponível: http://www.who.int/features/factfiles/global_burden/facts/en/index1.html. Acedido em 12 dezembro 2011
- WHO, World Health Organization, (2005). Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- Williamson G. e Manach C., (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81** (suppl), 243S–245S.
- Wogan G.N., Hecht S. S., Felton S. J., Conney A. H. e Loebe L.A., (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, **14**, 473–486
- Wolfe K.L., Kang X., He, X., Dong M., Zhang, Q. e Liu R.H., (2008). Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 8418-8426.
- Yen G.C. e Chen H.Y., (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**(1), 27–32.
- You Q., Wang B., Chen F., Huang Z., Wang X. e Luo P.G., (2011). Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry*, **125**, 201–208.
- Youdim K.A., McDonald J., Kalt W. e Joseph J.A., (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 282-288.

- Yu B.P., (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, **74**, 139-62.
- Zafra-Stone S., Yasmin T., Bagchi M., Chatterjee A., Vinson J.A. e Bagchi D., (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, 675–683.
- Zardernowski R., Nacz M. e Nesterowicz J., (2005). Phenolic Acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2118-2124.
- Zwart L.L., Meerman J.H.W., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E., (1999). Biomarkers of radical damage. Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology Medicine*, **26**, 202-206.